

Untersuchungen zur Initiation der Translation in halophilen Archaea

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Simone Sartorius-Neef

aus Einhausen

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Kathryn Nixdorff
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Eingereicht am: 14.12.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2005

Darmstadt 2005

Für meine beiden Kinder
Tobias und Franziska

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas, für die netten Gespräche und Diskussionen, die immer wieder zu neuen Ideen angeregt haben und vor allem für den Freiraum bei der Durchführung der Arbeit und die gute Betreuung.

Bei HD Dr. Arnulf Kletzin möchte ich mich bedanken für seine Hilfsbereitschaft, wenn der Computer mal wieder nicht das machte, was ich wollte.

Bei Peter Zimmermann, Torsten Hechler und Sandra Scheuch möchte ich mich bedanken für die Diskussionsbereitschaft und das nette Arbeitsklima im Halo-Labor, besonders bei Sandra für ihre hilfreiche Arbeit während ihres Forschungspraktikums. Auch bei allen anderen Arbeitskollegen Tim, Karin, Fabian, Alexander, Melanie, Sabrina und Rita, sowie allen ehemaligen Kollegen ein herzliches Dankeschön für eine schöne Zeit.

Unseren guten „Laborgeistern“ Bettina Basso, Renate Fröhlich und Gaby Liebing, ein Dankeschön für die nette Zusammenarbeit. Vor allem ein dickes Dankeschön an Bettina, die mir wirklich viel geholfen hat. Nicht zu vergessen ein Dank auch an unsere Spülfrauen Nam-Suk Polin und Cordula Bernhard, ohne die unsere Arbeit schnell zum Erliegen käme.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Oma Kätha für die vielen Stunden der Kinderbetreuung in den ersten Jahren des Studiums. Ohne Sie wäre das Studium gar nicht möglich gewesen, von Promotion ganz zu schweigen.

Auch meinen Eltern möchte ich danken für die Unterstützung und die immer wieder aufmunternden Worte, wenn ich glaubte Familie und Promotion doch nicht unter einen Hut zu bekommen. Ganz besonders meine Vater der die Stelle des „Tagesopa“ übernommen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen beiden Kindern Tobias und Franziska, die so oft auf mich verzichten mussten und sich niemals beschwert haben, wenn ich mal keine Zeit hatte. Auch bei meinem Mann Klaus möchte ich mich bedanken, dass er mich unterstützt hat, wann und wo immer er konnte.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	4
Halophilie: Die Liebe zum Salz	5
Halobakterien.....	8
Gasvesikel	9
Gasvesikelkodierende Gene und deren Expression	11
Die Gasvesikelgene aus <i>Hb. salinarum</i> PHH1: ein Modellsystem.....	13
Transkription und Genregulation in Archaea	13
Archaeale Translation.....	14
Untersuchungen der Genregulation in halophilen Archaea	19
Ziel dieser Arbeit	20
Material und Methoden	21
Material	21
Besondere Materialien und Chemikalien.....	21
Synthetische Oligonukleotide.....	22
Verwendete Organismen	23
Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotika-Resistenzen)	23
Methoden	24
Wachstumsbedingungen	24
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
Molekularbiologische Standardtechniken	26
Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten	27
Transformation von <i>Haloferax volcanii</i> WFD11.....	27
Konstrukte für die Transformation von <i>Hf. volcanii</i> WFD11	27
Plasmidisolierung	33
Southern-Analyse	33
RNA-Isolierung	34
Northern-Analyse	34
Isolierung von halobakteriellen Proteinen für Western-Analysen.....	36
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
Western-Analyse	36
Proteindetektion durch Chemilumineszenz.....	37

Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität der <i>BgaH</i>	37
Ergebnisse	39
1. Untersuchung der potentiellen SD-Sequenz vor dem <i>p-gvpH</i>-Gen.....	39
1.1 Mutation der SD-Sequenz des <i>p-gvpH</i> -Gens mit <i>GvpH</i> als Reporter.....	40
Expression des <i>p-gvpH</i> -Gens	41
1.2 <i>Scanning</i> -Mutagenese des 5'-UTR des <i>p-gvpH</i> -Gens mit dem <i>bgaH</i> -Reportergen ..	43
Analyse der verschiedenen SD-Transformanten	45
1.3 Deletion des 5'-UTR des <i>p-gvpH</i> -Gens	50
Analysen der Δ lead- und Δ SD-Transformanten	51
1.4 Bestimmung des optimalen Abstandes zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon.....	53
Analyse der verschiedenen SD-Abstandsmutanten	54
2. Untersuchungen zur Funktion des <i>p-gvpA</i>-mRNA-<i>leaders</i>	57
2.1 Mutagenese des <i>p-gvpA</i> -mRNA- <i>leaders</i>	57
Analyse der verschiedenen mTL-Transformanten	58
2.2 Untersuchungen des <i>p-gvpA</i> -mRNA- <i>leaders</i> mit dem <i>GvpA</i> -Protein als Reporter	62
Analysen mit <i>p-gvpA</i> als Reporter	62
2.3 Untersuchungen des <i>p-gvpA</i> -mRNA- <i>leaders</i> mit dem <i>bgaH</i> -Reportergen.....	65
Analysen mit dem <i>bgaH</i> -Gen als Reporter	66
3. Untersuchung der Translation von <i>leader</i>-losen mRNAs	70
3.1 Deletion des mRNA- <i>leaders</i> von <i>p-gvpA</i> , <i>p-gvpD</i> und <i>p-gvpF</i>	70
Analyse der verschiedenen P_A^- , P_D^- und P_F^- -Transformanten	72
Überprüfen der β -Galaktosidase-Aktivität mit X-Gal und Quantifizierung mittels ONPG	73
3.2 Vergleich der verschiedenen p-vac-Promotoraktivitäten	75
Bestimmung der Promotorstärke der vier p-vac-Promotoren.....	76
4. Konstruktion eines Vektors zur Überexpression von <i>p-gvpE</i>	77
Herstellung des P_A - <i>gvpE</i> -Konstrukts	78
Überprüfen der Expression des P_A - <i>gvpE</i> -Gens mittels SDS-Polyacrylamidgel	78
Überprüfen der Expression des P_A - <i>gvpE</i> -Gens mittels Western-Analyse	79
Diskussion	81
Untersuchungen zur Funktion der SD-Sequenz des <i>p-gvpH</i> -Gens	81
Bestimmung des optimalen Abstandes zwischen SD-Sequenz und Startcodon.....	83
Untersuchungen eines mRNA- <i>leaders</i> ohne SD-Sequenz.....	84
Untersuchungen eines verkürzten <i>p-gvpA</i> -mRNA- <i>leaders</i>	86

Untersuchungen zur Initiation der Translation von <i>leader</i> -losen mRNAs.....	87
Vergleich der vier p-vac-Promotoren.....	90
Konstruktion eines Vektors zur Überexpression von p- <i>gvpE</i>	92
Fazit/Ausblick.....	92
Literaturverzeichnis	94
Abkürzungsverzeichnis.....	104
Anhang	105
Lebenslauf	105
Erklärungen.....	106

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Initiation der Translation in halophilen Archaea untersucht. Dazu wurden die *p-gvp*-Gene aus dem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH1 verwendet. Die 14 an der Gasvesikelsynthese beteiligten Gene sind in der *p-vac*-Region auf dem Plasmid pHH1 lokalisiert und in zwei Operons angeordnet. Alle *gvp*-Gene besitzen mit Ausnahme von *p-gvpA* und *p-gvpO* stromaufwärts vom Startcodon eine purinreiche Sequenz, die zu einer Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA komplementär ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SD-Sequenz des *gvpH*-Gens mit dem GvpH-Protein und dem *bgaH*-Gen, das für ein halobakterielles Protein mit β -Galaktosidase-Aktivität kodiert, untersucht. Die zunächst durchgeführte Western-Analyse mit einem gegen das GvpH-Protein gerichteten Antiserum zeigte eine Reduktion der GvpH-Proteinmenge, wenn die SD-Sequenz von GGAGGUCA nach CCUAAACC mutiert wurde. Das Ergebnis lieferte somit erste Hinweise darauf, dass die SD-Sequenz für die Initiation der Translation zwar wichtig, aber nicht zwingend erforderlich ist. Um die Translation besser zu quantifizieren, wurde der *bgaH*-Leserahmen an den 5'-UTR des *gvpH*-Gens fusioniert und dieser mittels einer *scanning*-Mutagenese mutiert. Durch diese Mutageneseserie konnte die SD-Sequenz des *gvpH*-Gens auf die 7 nt stromaufwärts des Startcodons gelegene, zur 16S rRNA komplementäre Sequenz GGAGGUCA festgelegt werden. Als Kernmotiv der SD-Sequenz wurde GGAGG bestimmt, da Mutationen in dieser Region die Translation, mit einer Reduktion auf 5 bis 20% der Ausgangsaktivität im WT, am stärksten beeinflussten. Eine vollständige Mutation der SD-Sequenz führte zwar zu einer starken Reduktion (20% der Ausgangsaktivität) der Translation, aber nicht zum vollständigen Verlust. Damit wurde gezeigt, dass die SD-Sequenz zwar wichtig für eine effiziente Translation ist, aber nicht essentiell. Mit Hilfe von Deletions- und Insertionsmutanten wurde der Abstand zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon verändert. Die Analysen zeigten, dass der Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz 4 bis 10 nt betragen kann.

Für die Charakterisierung eines mRNA-*leaders*, der keine mögliche SD-Sequenz zeigt, wurde der 20 nt lange 5'-UTR der *p-gvpA*-mRNA verwendet. Die durchgeführte *scanning*-Mutagenese des mRNA-*leaders* zeigte keinen Bereich der für die Initiation der Translation von besonderer Bedeutung ist. Die Northern-Analyse ergab, dass auch die Stabilität der mRNA scheinbar nicht von einer bestimmten Sequenz bzw. Struktur im mRNA-*leader* abhängt, da in allen Transformanten die *bgaH*-mRNA in annähernd der gleichen Menge detektiert wurde.

Eine Verkürzung des *gvpA*-mRNA-*leaders* von 20 auf 14 nt zeigte sowohl in der Analyse mit dem GvpA-Protein als auch mit der BgaH als Reporter, dass die Transkriptmenge in allen vier Fällen gleich blieb und die unterschiedlichen mRNA-*leader* keinen Einfluss auf die mRNA-Stabilität haben. Im Falle der *gvpA*-mRNA wurde das verkürzte Transkript stärker translatiert (Δ TL-*gvpA*-Transformante), als die mRNA mit dem vollständigen *leader*-Bereich. Die Untersuchungen mit dem *bgaH*-Gen als Reporter lieferten ähnliche Ergebnisse. Die gemessene spezifische Aktivität der BgaH in der Transformante mit dem verkürzten *gvpA*-mRNA-*leader* (Δ TL_A-*bgaH*-Transformante) war im Vergleich zum WT 40fach höher. Eine vollständige Deletion des *gvpA*-mRNA-*leaders* (Δ L_A-*bgaH*-Transformante) führte sogar zu einer 100fachen höheren BgaH-Aktivität im Vergleich zum WT. Da das *bgaH*-Transkript in allen Fällen in gleicher Menge detektiert wurde, muss die *leader*-lose mRNA deutlich besser translatiert werden, als die *leader*-haltige mRNA.

Um zu Prüfen, ob dies ein genereller Effekt ist, wurden die mRNA-*leader* des p-*gvpD* und p-*gvpF*-Gens deletiert und mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert. Die Expression dieser Konstrukte in Transformanten wurde mit der Expression des jeweiligen *leader*-haltigen Konstrukts verglichen. Bei der Transformante, die das Konstrukt mit dem *gvpD*-mRNA-*leader* besaß, wurde die *bgaH*-mRNA in der gleichen Menge detektiert wie in der Transformante, die das *leader*-lose Konstrukt besaß (Δ L_D-*bgaH*-Transformante). Allerdings konnte bei der Transformante mit dem *leader*-haltigen Konstrukt keine BgaH-Aktivität gemessen werden. Vermutlich ist die BgaH-Aktivität zu gering und liegt unter der Nachweisgrenze der β -Galaktosidase-Aktivität, die mittels des ONPG-Tests nachweisbar ist. Bei der Transformante mit dem *leader*-losen Konstrukt (Δ L_D-*bgaH*-Transformante) konnte dagegen BgaH-Aktivität gemessen werden. Bei der Untersuchung des *gvpF*-mRNA-*leaders*, wurde nur bei der Transformante β -Galaktosidase-Aktivität gemessen, die das *leader*-lose Δ L_F-*bgaH*-Konstrukt enthielt. Allerdings wurde bei dieser Transformante mehr des *bgaH*-Transkripts nachgewiesen. Demnach destabilisiert der *gvpF*-mRNA-*leader* die mRNA. Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass *leader*-lose mRNAs sehr effizient translatiert werden.

Da die *leader*-losen mRNAs der Konstrukte (Δ L_A-, Δ L_D-, Δ L_F- und O-*bgaH*) identisch sind und somit auch die daraus resultierende BgaH, konnten die vier p-vac-Promotoren verglichen werden. Die Analysen zeigten, dass der P_A-Promotor der stärkste der vier p-vac-Promotoren ist.

Auf der Basis der in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse, dass *leader*-lose mRNAs deutlich besser translatiert werden als *leader*-haltige mRNAs, wurde ein Vektor zur Überexpression von p-*gvpE* konstruiert, mit dem Ziel ausreichende Mengen an GvpE-Protein zu erhalten, um es nach biochemischer Reinigung für die Kristallation einsetzen zu können. Dazu wurde der

P_A-Promotor, von dem bekannt ist, dass er durch pGvpE stimuliert wird, mit dem p-*gvpE*-Leserahmen fusioniert.

Die Analyse über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigte im Zelllysate der P_A-*gvpE*-Transformante zwei verstärkte Proteinbanden in Höhe von 55 kDa und 30 kDa, die dem pGvpE-Protein entsprechen könnten.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2004) *In vivo* studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 51: 579-588.

Pfeifer F., Zimmermann P., Scheuch S., Gregor D. und Sartorius-Neef S. (2005)

Gene regulation and initiation of translation in halophilic archaea

In: „*Cellular Origins, Life in Extreme Environments and Astrobiology*“; Vol. 9 (eds. N Gunde-Cimerman, A Plemenitas & A Oren), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. Eingereichter Review, im Druck.

Einleitung

Alle Lebewesen dieser Erde lassen sich einer der drei Domänen Bakterien, Archaea oder Eukaryonten zuordnen. Zunächst bezeichnete man die Archaea als Archaeobakterien und ordnete sie zu den Bakterien. Erst in den 70er Jahren gelang es Carl Woese mit Hilfe von 16S und 18S rRNA-Analysen zu zeigen, dass die Archaeobakterien phylogenetisch eine eigene Domäne bilden (Woese *et al.*, 1977). Archaeobakterien unterschieden sich in vielerlei Hinsicht von den Bakterien und weisen einige eukaryotische Merkmale auf. Fortan werden sie als Archaea bezeichnet, abgeleitet von dem griechischen Wort *archae*, was soviel bedeutet wie „uralt“ oder „altertümlich“. Viele Archaea sind Extremophile, das heißt man findet sie vor allem in Biotopen, in denen extreme Umweltbedingungen herrschen, wie etwa Temperaturen bis zu 121°C (Kashefi & Lovley, 2003), pH-Werte von nahezu 0 (Schleper *et al.*, 1995) oder pH 12 (Jones *et al.*, 1989) oder Salzkonzentrationen von bis zu 5 M NaCl (Oren *et al.*, 1994). In den letzten Jahren zeigte sich allerdings, dass Archaea nicht nur an extremen Standorten zu finden sind, sondern ubiquitär vorkommen (DeLong, 1992, Fuhrman *et al.*, 1992).

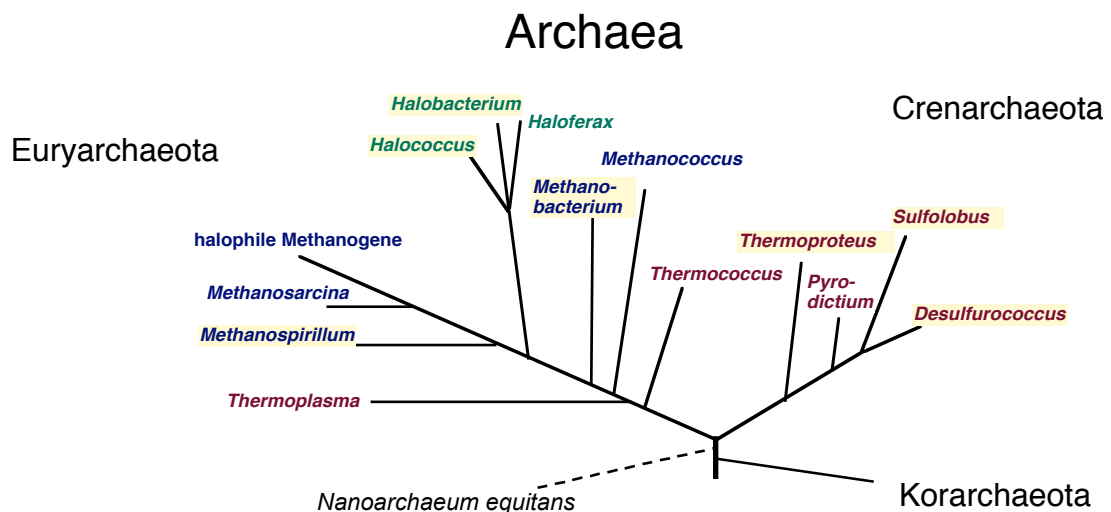


Abb. 1 Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA-Sequenzvergleichen nach C. Woese, verändert. Die Abzweigung der Nanoarchaea wurde als gestrichelte Linie dargestellt, da ihre Abzweigung im Stammbaum unsicher ist.

Die Domäne der Archaea wird unterteilt in Crenarchaeota mit den thermophilen und zum Teil schwefelabhängigen Archaea, sowie den Euryarchaeoten, zu denen neben einigen thermophilen Vertretern die Halophilen und Methanogenen gehören (Abbildung 1). Tiefer im Stammbaum zweigen die Korarchaeota ab, die nur von 16S rRNA-Studien bekannt sind und von denen es bisher keine kultivierten Isolate gibt (Barns *et al.*, 1996, Reysenbach *et al.*,

2000) und die Nanoarchaea (Abbildung 1). Dies sind kleine, auf einer Wirtszelle „reitende“ Zellen, die keinen eigenen Stoffwechsel treiben, aber alle Gene zur Zellteilung und Proteinbiosynthese besitzen. Bisher ist nur *Nanoarchaeum equitans* als einziger Organismus bekannt (Huber *et al.*, 2002).

Halophilie: Die Liebe zum Salz

Alle aquatischen Lebensräume sind von Organismen besiedelt, unabhängig davon, ob es sich um Süßwasser, marine Gewässer, hypersaline Salzseen, dem Toten Meer oder Meersalzgewinnungsanlagen handelt, bei denen Salzkonzentrationen bis zur Sättigung vorliegen. Hypersaline Lebensräume entstehen meist durch Verdunstung von Meerwasser, man findet sie daher in den heißen und trockenen Regionen der Erde. Die vorherrschenden Kationen sind Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} , die vorherrschenden Anionen Cl^- , SO_4^{2-} und CO_3^{2-} (Rodriguez-Valera, 1993; Sehgal & Gibbons, 1960). Die Ionenkonzentrationen können sehr unterschiedliche sein und hängen von den umgebenden Gesteinen ab. Beispielsweise entspricht die Ionenzusammensetzung des Großen Salzsees in Utah mehr oder weniger der Meerwasserzusammensetzung. Soda-Seen entsprechen in ihrer Zusammensetzung hypersalinen Salzseen. Durch die erhöhte Karbonatkonzentration weisen sie einen deutlich erhöhten pH-Wert (pH 10-12) auf. Die vorherrschende Salzkonzentration ist nicht der limitierende Faktor für die Besiedlung hypersaliner Habitats. Allerdings stellt diese eine besondere Anforderung an die Organismen, die dem drohenden Wasserverlust, auf Grund der hohen Salzkonzentrationen in der Umgebung, entgegenwirken müssen. Halophile Organismen besitzen nicht nur die Fähigkeit bei hohen Salzkonzentrationen bis zu 5,2 M NaCl zu wachsen, sondern sie benötigen sogar eine minimale Salzkonzentration von 1,5 M (9%).

Extrem halophile und halotolerante Vertreter findet man in allen drei Domänen des Lebens: Bakterien, Archaea und Eukaryonten. Die Eukaryonten sind fast ausschließlich durch verschiedene Arten der Grünalge *Dunaliella* vertreten. *Dunaliella*-Arten wachsen über einen weiten Bereich verschiedener Salzkonzentrationen bis hin zu 5 M NaCl (30%) (Avron, 1986). Sie sind meist die dominierenden, wenn nicht sogar einzigen Primärproduzenten in hypersalinen Habitats.

In der Domäne der Bakterien findet man halophile Vertreter innerhalb der verschiedenen Subgruppen, wo sie gemeinsam mit nicht-halophilen Vertretern vorkommen. So enthalten z.B. die γ -Gruppe der Proteobakterien, die Cyanobakterien, sowie einige Gram-positive Stäbchen und Cocci halophile Vertreter. Mit wenigen Ausnahmen (z.B. *Ectothiorhodospira*

und *Halorhodospira*) sind halophile Bakterien eher halotolerant und kommen überwiegend in Habitaten mit niedrigen Salzkonzentrationen vor (Madigan & Oren, 1999).

Innerhalb der Domäne der Archaea finden sich halophile Vertreter innerhalb der Familie der Halobacteriaceae, die durchweg halophil sind und eine Salzkonzentration von mindestens 1,5 M NaCl zum Wachsen benötigen und bei den Methanogenen (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus*). Die meisten Halobacteriaceae besitzen ein Wachstumsoptimum bei einer Salzkonzentration von 3,5 bis 4,5 M NaCl, können aber auch in einer gesättigten Lösung mit 5,2 M NaCl noch wachsen (Grant W.D. & Larsen H., 1989).

Da biologische Membranen durchlässig für Wasser sind, erfordert das Leben in hypersalinen Habitaten besondere Anpassungsstrategien. Um dem drohenden Wasserverlust durch die hohe Salzkonzentration der Umgebung entgegen zu wirken, werden zwei unterschiedliche Strategien verwendet: 1.) die *salt-in*-Strategie, bei der Kaliumchloridionen im Zellinnern akkumuliert werden und die eine Anpassung der zellulären Komponenten an die hohe Salzkonzentration erforderlich macht und 2.) die *compatible solute*-Strategie, bei der kleine organische Moleküle im Zellinnern angereichert werden; eine Anpassung der zellulären Bestandteile ist hier nicht erforderlich.

Die *salt-in*-Strategie wird von zwei phylogenetisch nicht verwandten Gruppen verwendet, nämlich den aerob extrem halophilen Archaea der Gruppe der *Halobacteriales* und den anaeroben halophilen Bakterien der Gruppe der *Haloanaerobiales* (Oren, 1999). Im Cytoplasma werden Salzkonzentrationen erreicht, die mit dem Außenmedium isoosmotisch sind (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Im Gegensatz zum Außenmedium, das überwiegend NaCl enthält, wird bei der *salt-in*-Strategie im Zellinnern überwiegend KCl angereichert (Dennis & Shimmin, 1997). Das extrem halophile Archaeon *Halobacterium salinarum* (*Hb. salinarum*) enthält beispielsweise 4 M KCl und 1 M NaCl, wobei das KCl meist in freier Form vorliegt (Grant & Larsen, 1989; Shporer & Civan, 1977). Die hohe Salzkonzentration im Zellinnern erfordert physiologische Veränderungen, um die regulatorischen und metabolischen Prozesse der Zelle aufrecht zu erhalten. Im Laufe der Evolution haben sich die halophilen Proteine in ihrer Struktur und chemischen Eigenschaften den hohen Salzkonzentrationen im Zellinnern angepasst. Dies geht soweit, dass die meisten halophilen Enzyme eine bestimmte Salzkonzentration brauchen, um aktiv zu sein. Im Vergleich zu nicht-halophilen Proteinen besitzen halophile Proteine einen hohen Anteil an Aminosäuren mit sauren Seitenketten wie Glutamin- und Asparaginsäure und nur einen geringen Anteil an Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Lanyi, 1974; Dennis & Shimmin, 1997; Oren, 1999). Bei einem physiologischen pH-Wert liegen die Seitenketten der Glutamin- und Asparaginsäure deprotoniert vor und sind damit negativ geladen. Die sauren Aminosäuren sind hauptsächlich auf der Oberfläche exponiert, was zu einer stark negativen

Ladung führt. Dies ermöglicht den halophilen Proteinen eine feste Hydrathülle zu binden, was sie unempfindlicher gegenüber dem dehydratisierenden Effekt durch die hohe Salzkonzentration der Umgebung macht (Lanyi, 1974; Eisenberg, 1992; Frolov *et al.*, 1996). Die Anhäufung von sauren Aminosäuren und anderen hydrophilen Aminosäuren wie Serin und Threonin an der Proteinoberfläche reduziert die Hydrophobizität des Proteins und verhindert dadurch den strukturellen Zerfall bzw. die Aggregation der Proteine (Aussalzeffekt) (Dennis & Shimmin, 1997). Möglicherweise bilden die sauren Aminosäuren auch Salzbrücken aus, die zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur beitragen (Dennis & Shimmin, 1997; Dym *et al.*, 1995). Ein Vergleich der Gene von halophilen Proteinen mit den äquivalenten Genen nicht-halophiler Bakterien zeigte, dass die Gene halophiler Organismen zwei bis drei Mal mehr nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen besitzen, im Vergleich zu den homologen bakteriellen Genen. Man vermutet, dass die Substitutionen einen Einfluss auf die Hydrophobizität und Hydratation der Proteinoberfläche haben (Dennis & Shimmin, 1997; Rodriguez-Valera, 1993; Sehgal & Gibbons, 1960).

Wie bereits erwähnt akkumulieren Halobakterien K^+ an Stelle von Na^+ im Zellinnern. Na^+ ist kleiner als K^+ und besitzt somit eine höhere Ladungsdichte, dementsprechend bildet Na^+ eine größere Hydrathülle als K^+ . Dies bedeutet, dass eine bestimmte Menge an Na^+ -Ionen mehr H_2O -Moleküle bindet, als die gleiche Menge K^+ -Ionen. K^+ ist daher günstiger als Na^+ , da mehr H_2O -Moleküle für intrazelluläre Prozesse und für die Hydrathülle der Proteine zur Verfügung steht, weswegen es vermutlich bevorzugt wird. Um KCl im Zellinnern zu akkumulieren, müssen K^+ und Cl^- -Ionen aufgenommen und im Gegenzug Na^+ -Ionen ausgeschleust werden. Die treibende Kraft für die Akkumulation von K^+ und die Extrusion von Na^+ ist der elektrochemische Protonengradient (*proton motive force*) über der Cytoplasmamembran. Der Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten erfolgt entweder durch die Prozesse der Atmungskette (innerhalb der *Halobacteriales* bei aerobem Wachstum) oder durch die Hydrolyse von ATP durch die membrangebundene ATPase (F-Typ H^+ -ATPase bei Bakterien, A-Typ ATPase bei Archaea). *Halobacterium salinarum* kann einen Protonengradienten mit Hilfe der lichtgetriebenen Aktivität des Bakteriorhodopsins aufbauen. Das Ausschleusen von Na^+ erfolgt mittels eines Antiporters, im Gegenzug wird ein H^+ -Proton aufgenommen (Lanyi & McDonalds, 1976). Da dieser Prozess vom elektrochemischen Protonengradient abhängt, handelt es sich um einen energieabhängigen Prozess. Die Aufnahme von K^+ erfolgt bei *Halobacterium* energieunabhängig mittels eines Uniporters (Wagner *et al.*, 1978), in *Haloferax* dagegen energieabhängig durch aktiven Transport (Meury & Kohiyama, 1989). Die Akkumulation von Chlorid-Ionen erfolgt energieabhängig über einen Na^+/Cl^- Symport (Rao & Argos, 1981), oder durch den lichtabhängigen Cl^- -Transporter Halorhodopsin.

Die meisten halophilen und halotoleranten Mikroorganismen benutzen die *compatible solute*-Strategie, bei der intrazellulär kleine organische Moleküle angereichert werden, um dem osmotischen Druck des Außenmediums auszugleichen. Diese *compatible solutes* werden entweder *de novo* synthetisiert oder falls vorhanden aus der Umgebung aufgenommen. *Compatible solutes* werden definiert als lösliche niedermolekulare Substanzen, die selbst in hoher Konzentration die Funktion der Enzyme nicht beeinträchtigen (Brown, 1990). *Compatible solutes* sind typischerweise niedermolekulare Moleküle, die in hoher Konzentration in Wasser löslich sind und bei physiologischem pH-Wert ungeladen oder zwitterionisch vorliegen. Die Liste der *compatible solutes* wächst ständig, einige typische *compatible solutes* sind Polyole (Glycerol, Arabitol), Zucker, Zuckerderivate (Sucrose, Trehalose), Aminosäure und deren Derivate wie Glycinbetain und Ectoin (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Für die Synthese der *compatible solutes* muss sehr viel Energie aufgewendet werden und ist daher für Organismen, die bei sehr hohen Salzkonzentrationen ($>1,5$ M NaCl) vorkommen, energetisch ungünstig. *Compatible solutes* werden von den meisten halotoleranten Bakterien, einigen halophilen methanogenen Archaea und der Grünalge *Dunaliella* verwendet. Halophile Archaea der Familie *Halobacteriaceae* verwenden keine *compatible solutes*.

Vergleicht man die *salt-in* mit der *compatible solute*-Strategie hinsichtlich der Energie in Form von ATP, die jeweils dafür benötigt wird zeigt sich, dass die *compatible solute*-Strategie für die Synthese von 1 Mol eines *compatible solutes* zum Ausgleich von 1 Mol NaCl im Schnitt 30-109 Mol ATP verbraucht (Oren, 1999). Bei der *salt-in*-Strategie wird für die Akkumulation von 1 Mol KCl zum Ausgleich von 1 Mol NaCl dagegen nur 0,5 bis 0,67 Mol ATP benötigt (Oren, 1999).

Halobakterien

Phylogenetisch gehören die Halobakterien zur Ordnung der Halobacteriales, die nur durch eine einzige Familie die *Halobacteriaceae* repräsentiert wird. Die Familie der *Halobacteriaceae* umfasst 18 Gattungen, die physiologisch in zwei Gruppen unterteilt sind. In der ersten Gruppe sind die *Halobacteriaceae* zusammengefasst, die bei neutralem pH-Wert (pH 5 bis 8) wachsen und eine Mg^{2+} -Konzentration von mindestens 5 mM benötigen. Dazu gehören z.B. *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax* und *Halobaculum* (Grant & Larsen, 1989; Kamekura, 1998). Die zweite Gruppe besteht aus haloalkaliphilen Isolat, die bei alkalischen pH-Werten (pH-Wert 8,5 bis 11,0) und einer Mg^{2+} -Konzentration von <1 mM wachsen. Dazu gehören u.a. die Gattungen *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Halorubrum*, *Natronomonas* und *Natronorubrum* (Grant & Larsen, 1989; Kamekura, 1998). Der Stoffwechsel der *Halobacteriaceae* ist meist strikt aerob, chemoorganotroph, als

Kohlenstoffquelle werden meist Aminosäuren verwendet. Einige Vertreter können auch anaerob wachsen, als terminalen Elektronenakzeptor benötigen sie Nitrat oder Fumarat (Marquez & Brodie, 1973; Oren, 1994). Halobakterien besitzen eine aussergewöhnliche Formenvielfalt, so findet man Stäbchen, Coccen, Dreiecke, quadratische Plättchen und diskusförmige Zellen. Viele Halobakterien sind pleomorph und bilden abhängig von Wachstumsphase und Medium unterschiedliche Zellformen (Grant & Larsen, 1989; Tindall, 1992). Es gibt bewegliche (mit polaren Flagellen) und unbewegliche Vertreter. Dauerformen sind nicht bekannt.

Halobakterien sind an hohe Salzkonzentrationen im Außenmedium angepasst und benötigen eine minimale Salzkonzentration von 1,5 M NaCl. Auf Grund der Salzkonzentration lassen sich die Halobakterien in zwei Gruppen unterteilen. Die moderat halophilen Archaea wie z.B. *Haloferax mediterranei* (*Hf. mediterranei*) und *Hf. volcanii* wachsen optimal bei einer Salzkonzentration von 2,5 bis 3 M NaCl und einer Mg^{2+} -Konzentration von 0,2 M, können aber bis zu einer NaCl-Konzentration von 4,5 M und einer Mg^{2+} -Konzentration von 1,5 M wachsen. Extrem halophile Archaea wie z.B. *Halobacterium salinarum* benötigen NaCl-Konzentrationen von 3,5 bis 5,2 M für ihr Wachstum, kommen aber mit einer minimalen Mg^{2+} -Konzentration von 0,005 M aus. Höhere Mg^{2+} -Konzentrationen als 0,5 M wirken sich dagegen negativ auf ihr Wachstum aus, was im Gegensatz zu den moderat halophilen Archaea ist (Grant & Larsen, 1989; Tindall, 1992). In ihren natürlichen Lebensräumen wie z.B. Salzseen oder Meersalzgewinnungsanlagen erreichen Halobakterien sehr hohe Populationsdichten von 10^7 bis 10^8 Zellen ml^{-1} (Post, 1977). Die charakteristische rot-orange Färbung dieser Habitats ist auf die C_{40} -Carotinoide wie Lycopin und C_{50} -Carotinoide wie Bakterioruberin zurückzuführen, die in der Membran zum Schutz vor photooxidativen Schäden eingelagert werden (Grant & Larsen, 1989; Oren 2002). Da mit steigender Salzkonzentration die Löslichkeit von Sauerstoff abnimmt, besitzen viele Halobakterien die Fähigkeit, Gasvesikel zu bilden. Mit Hilfe der Gasvesikel können sie ihre Schwebedichte verringern, um an die Gewässeroberfläche zu gelangen, wo Licht und Sauerstoff in ausreichender Menge vorhanden ist.

Gasvesikel

Zu den gasvesikelbildenden Spezies gehören *Halobacterium salinarum*, *Haloferax mediterranei* und *Halorubrum vacuolata* (früher *Natrobacterium vacuolatum*) (Stoeckenius & Kunau, 1968; Englert *et al.*, 1990; Mwatha & Grant, 1993; Pfeifer *et al.*, 1997). Die Gasvesikelbildung ist nicht nur den halophilen Archaea vorbehalten, sondern eine ganze Reihe weiterer Archaea und Bakterien besitzen diese Fähigkeit. So wurden Gasvesikel bei vielen Cyanobakterien wie *Anabaena flos-aquae*, *Calothrix* und *Nostoc*, dem heterotrophen,

Gram-negativen Bakterium *Ancylobacter aquaticus* und dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina barkeri* beobachtet (Zhilana & Zavarin, 1979; Walsby, 1994; Konopka *et al.*, 1975). Gasvesikel sind wasserundurchlässige, gasgefüllte, intrazelluläre Hohlkörper, die einzig aus Protein aufgebaut sind (Krantz & Ballou, 1973). Durch ihre stark lichtbrechenden Eigenschaften sind Gasvesikel im Phasenkontrastmikroskop als hell-leuchtende Bereiche innerhalb der Zelle zu erkennen. Die wohl wichtigste Funktion der Gasvesikel ist den Zellen Auftrieb zu verleihen, um in Wasserschichten mit höherer Sauerstoffkonzentration und besseren Lichtverhältnissen zu gelangen (Walsby, 1994). Eine weitere Funktion ist möglicherweise der Schutz vor photooxidativen Schäden durch ihre lichtbrechende Eigenschaft (Shear & Walsby, 1975). Des Weiteren wird durch die Bildung von Gasvesikeln das Oberflächen/Volumen Verhältnis reduziert, dadurch verkürzen sich die Diffusionswege, wodurch eine bessere Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Im Elektronenmikroskop sind isolierte Gasvesikel als zylindrische oder zitronenförmige Zelleinschlüsse mit konischen Enden zu sehen (Jost, 1965; Simon, 1981; Englert *et al.*, 1990). Größe und Gestalt der Gasvesikel variiert zwischen den verschiedenen Organismen. Halobakterielle Gasvesikel haben einen Durchmesser von etwa 200 nm und können zylindrisch (600 bis 1500 nm lang) oder zitronenförmig (250 nm) sein (Stoeckenius & Kunau, 1968; Simon, 1981; Englert *et al.*, 1990). Die Gasvesikel der Cyanobakterien sind dagegen 100 bis 800 nm lang und haben einen Durchmesser von nur 45 bis 120 nm (Walsby & Hayes, 1989; Walsby, 1994). Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine charakteristische Rippenstruktur, wobei die Rippen senkrecht zur Zylinderlängsachse angeordnet sind (Jost, 1965; Stoeckenius & Kunau, 1968; McMaster *et al.*, 1996). Auf der äußeren Oberfläche der Gasvesikel, die dem Cytoplasma zugewandt ist, befinden sich vor allem hydrophile Aminosäuren, wohingegen an der inneren Oberfläche in der Regel hydrophobe Aminosäuren bevorzugt vorkommen (Walsby, 1972; Walsby & Hayes, 1989). Durch diese Anordnung können Gase ins Innere der Gasvesikel diffundieren, nicht aber Wasser. Gasvesikel enthalten alle Gase, die gelöst im Cytoplasma vorkommen und durch passive Diffusion ins Innere der Gasvesikel gelangen (Walsby, 1969). Eine selektive Anreicherung von Gasen konnte bisher nicht beobachtet werden (Walsby & Hayes, 1989). Das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle ist das 7 bis 8 kDa große, hydrophobe GvpA-Protein (*gas vesicle protein*), das überwiegend β -Faltblattstrukturen ausbildet (Blaurock & Wober, 1976). Das GvpA-Protein macht über 95% des gesamten Gasvesikelproteingehalts aus und bildet die 4,6 nm breite Rippenstruktur (Walsby, 1994; Offner *et al.*, 1998). Innerhalb der gasvesikelbildenden Archaea ist das GvpA-Protein hochkonserviert und besitzt eine Ähnlichkeit von 92 bis 96% in der Aminosäuresequenz (Englert *et al.*, 1990). An der Außenseite der GvpA-Hülle befindet sich als weiteres Strukturprotein das 20 bis 42 kDa große, hydrophile GvpC-Protein (Englert & Pfeifer, 1993;

Hayes *et al.*, 1992; Kinsman *et al.*, 1995). Bei Cyanobakterien konnte gezeigt werden, dass das GvpC-Protein die GvpA-Hülle stabilisiert, während es bei Halobakterien an der regelmäßigen Form des zylindrischen Mittelteils und auch der Länge maßgeblich beteiligt ist (Hayes *et al.*, 1992; Englert & Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996; Best, 2000). Das GvpC-Protein ist zwar weniger konserviert als das GvpA-Protein, dennoch zeigen alle GvpC-Proteine ähnliche Strukturmerkmale. Die verschiedenen GvpC-Proteine der Halobakterien enthalten fünf bis sieben Sequenzwiederholungen von 25 bis 38 Aminosäuren, während 33 Aminosäuren beim cyanobakteriellen GvpC-Protein beobachtet wurden (Englert *et al.*, 1992a; Walsby, 1994). Jede dieser Sequenzwiederholung könnte eine der GvpA-Rippen überspannen und GvpC könnte so mehrere GvpA-Rippen vernetzen. Die Proteine GvpJ und GvpM zeigen eine Aminosäureähnlichkeit von 42 bis 54% zu GvpA und sind ebenfalls Strukturproteine (Englert *et al.*, 1992a, Shukla & DasSarma, 2004). Mittels Western-Analysen mit isolierten Gasvesikeln aus *Hb. salinarum* sp. NRC-1 konnten auch die Proteine GvpF, GvpG und GvpL als weitere Gasvesikelproteine hier detektiert werden (Shulka & DasSarma, 2004).

Gasvesikelkodierende Gene und deren Expression

Die an der Gasvesikelsynthese beteiligten Gene sind in einer etwa 9 kb großen, so genannten vac-Region (*gas vacuole coding region*) lokalisiert. Das extrem halophile Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH1 (*Hb. salinarum*), ein naher verwandter Stamm zu *Hb salinarum* sp. NRC-1, besitzt zwei verschiedene vac-Regionen (Abbildung 2). Die p-vac-Region, auf dem 150 kb großen Plasmid pHH1 und die c-vac-Region, die im Chromosom lokalisiert ist (Horne & Pfeifer, 1989; Horne *et al.*, 1991). Jede dieser vac-Regionen enthält die 14 *gvp*-Gene und ist zur Gasvesikelbildung in der Lage. Die vorkommenden zitronenförmigen Gasvesikel werden nur von der p-vac-Region aus während der gesamten Wachstumszeit gebildet. *Hb. salinarum* PHH4 fehlt die gesamte p-vac-Region auf dem Plasmid pHH4 und die Bildung der zylindrischen Gasvesikel erfolgt von der c-vac-Region aus (Abbildung 2), allerdings nur in der stationären Wachstumsphase (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). In dem bereits vollständig sequenzierten Genom von *Halobacterium salinarum* sp. NRC-1 befinden sich insgesamt drei vac-Regionen. Zwei *gvp1*-Genregionen, die mit der p-vac-Region nahezu identisch sind, sind auf dem 191 kb großen Plasmid pNRC100 und auf dem 365 kb großen Plasmid pNRC200 lokalisiert (Jones *et al.*, 1991; DasSarma *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 2000). Auf dem Plasmid pNRC200 befindet sich auch eine *gvp2*-Genregion, die sehr ähnlich der c-vac-Region ist, der aber das *gvpM*-Gen fehlt und die dadurch keine Gasvesikel bilden kann (Ng *et al.*, 2000). Die bislang größte identifizierte vac-Region besitzt *Hf. mediterranei*, die mc-vac-Region (*m*editerranei

chromosomal), die chromosomal codiert ist und die ebenfalls zur Bildung von zylinderförmigen Gasvesikeln führt. Die Gasvesikelbildung ist hier zusätzlich von der Salzkonzentration abhängig, d.h. Gasvesikel werden erst bei einer Salzkonzentration von >17% NaCl im Medium gebildet (Rodriguez-Valera, 1993; Englert *et al.*, 1990). Die Anordnung der Gasvesikelgene der mc-vac-Region ist mit der der p-vac und c-vac-Region identisch; die einzelnen *gvp*-Gene zeigen allerdings eine größere Verwandtschaft zu den Genen der p-vac-Region als zur c-vac-Region (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a).

Halobacterium salinarum PHH1

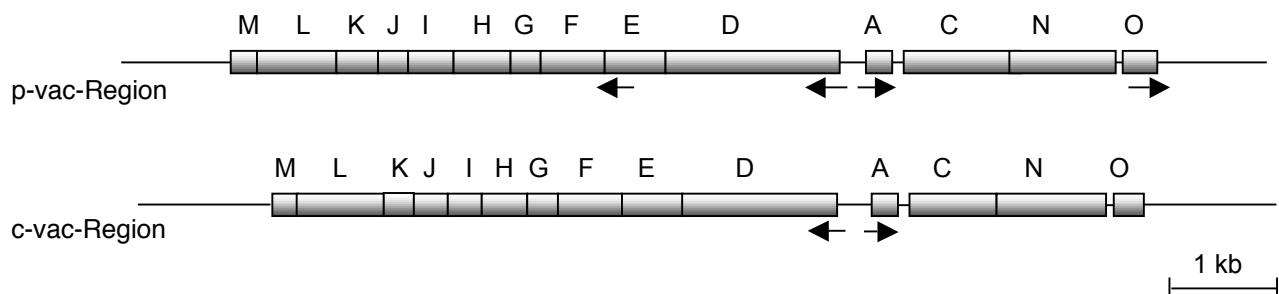


Abb. 2 Gasvesikelcodierende Region von *Halobacterium salinarum* PHH1 (p-vac und c-vac-Region). Die 14 *gvp*-Gene *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* sind als Kästchen dargestellt, die Buchstaben über der vac-Region geben das jeweilige Gen an. Die Pfeile zeigen die Lage der Promotoren und die jeweilige Transkriptionsrichtung an.

Die 14 an der Gasvesikelsynthese beteiligten Gene der p-vac, c-vac und mc-vac-Region sind in zwei Gruppen angeordnet. Die Gene *gvpDEFGHIJKLM* und davon stromaufwärts des *gvpA*-Gens in umgekehrter Orientierung *gvpACNO* (Abbildung 2). Die Gene der verschiedenen vac-Regionen sind zwar miteinander verwandt und identisch angeordnet, unterscheiden sich aber in ihrem Transkriptionsmuster. Die Transkription der p-vac-Region erfolgt von vier Promotoren, die vor den Genen *p-gvpA*, *p-gvpD*, *p-gvpF* und *p-gvpO* liegen und zu 5 unterschiedlichen Transkripten führen: *p-gvpA*, *p-gvpACNO*, *p-gvpO*, *p-gvpDE* und *p-gvpFGHIJKLM* (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a; Offner *et al.*, 1996). Die *p-gvpA*-mRNA wird während des gesamten Wachstums in großen Mengen gebildet, während das *gvpACNO* Transkript nur in geringen Mengen (<5%) gebildet wird (Horne & Pfeifer, 1989; Horne *et al.*, 1991; Offner & Pfeifer, 1995). Die Transkripte *p-gvpO* und *p-gvpFGHIJKLM* werden nur während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, das Transkript *p-gvpDE* dagegen nur in der stationären Wachstumsphase (Offner *et al.*, 1996; Offner & Pfeifer, 1995; Jones *et al.*, 1989; Horne *et al.*, 1991). Die Expression der c-vac und mc-vac-Region wird nur von zwei Promotoren aus gesteuert, die sich vor den Genen *gvpA* und *gvpD* befinden (Horne & Pfeifer, 1989; Krüger & Pfeifer, 1996; Englert *et al.*, 1990;

Englert & Pfeifer, 1993; Röder & Pfeifer, 1996). Die Funktion einiger Gasvesikelgene konnte bereits bestimmt werden. Die beiden Proteine GvpD und GvpE sind an der Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Englert *et al.*, 1992b). Das GvpE-Protein ist ein Transkriptionsaktivator, das den *gvpA*-Promotor stimuliert (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001). Im Gegensatz dazu ist das GvpD-Protein an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 1994; Hofacker *et al.*, 2004; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Transformationsstudien mit *Hf. volcanii* WFD11 als Empfängerstamm zeigen, dass lediglich die acht Gene *gvpFGJKLM* und *gvpAO* für die Bildung von Gasvesikeln notwendig sind (Offner *et al.*, 2000).

Die Gasvesikelgene aus *Hb. salinarum* PHH1: ein Modellsystem

Die Gasvesikelgene von Halobakterien eignen sich gut als Modellsystem, um archaeale Genexpression zu studieren, da ihre Expression abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren wie z.B. Sauerstoff, Licht und Salzkonzentration reguliert wird.

Transkription und Genregulation in Archaea

Die archaeale Transkription ist insofern interessant, da sie sowohl bakterielle als auch eukaryotische Elemente besitzt. Schon vor mehr als zwanzig Jahren erhielt man erste Hinweise darauf, dass der basale Transkriptionsapparat der Archaea näher verwandt mit der eukaryotischen RNA-Polymerase II ist, als mit der bakteriellen RNAP (Zillig *et al.*, 1979). Die archaeale RNA-Polymerase besitzt zwischen 10 und 14 Untereinheiten, die alle jeweils homolog zu den entsprechenden Untereinheiten der eukaryotischen RNAP II sind (Zillig *et al.*, 1979; Langer *et al.*, 1995). Allerdings besitzen Archaea im Gegensatz zu den Eukaryonten nur eine RNAP, die für die Transkription aller Gene zuständig ist. Bakterien besitzen ebenfalls nur eine einzige RNAP, die viel einfacher aufgebaut ist und nur aus vier Untereinheiten besteht (Eick *et al.*, 1994; Busby & Ebright, 1994). Mit der eher eukaryotischen RNAP der Archaea geht auch der eher eukaryotische Promotor einher. Archaea besitzen 25 bis 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes eine konservierte Sequenz, die der TATA-Box der Eukaryonten ähnlich ist und oft als Box A bezeichnet wird (Reiter *et al.*, 1990; Hain *et al.*, 1992). Viele archaeale Promotoren besitzen auch stromaufwärts der TATA-Box eine purinreiche Region, die als BRE-Element bezeichnet wird und dem eukaryotischen *TFIIB-response element* entspricht (Lagrange *et al.*, 1998; Qureshi & Jackson, 1998; Bell *et al.*, 1999; Soppa, 1999). Für die Initiation der basalen

Transkription in Archaea werden zwei Initiationsfaktoren benötigt, das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und TFB, das archaeale Homolog zum eukaryotischen Transkriptionsinitiationsfaktor IIB (Hausner *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1995; Thomm, 1996; Reeve *et al.*, 1997). Der basale Transkriptionsapparat der Archaea ist damit einfacher aufgebaut, als das homologe System der RNAP II in Eukaryonten, der eine Vielzahl weiterer Initiationsfaktoren benötigt (Orphanides *et al.*, 1996).

Auf Grund der Tatsache, dass der basale Transkriptionsapparat der Archaea ähnlich dem der Eukaryonten ist, könnte man vermuten, dass auch die Regulation der Transkription ähnlich der eukaryotischen ist. In den Genomsequenzen bereits vollständig sequenzierter Archaea Genome findet man allerdings viele Homologe zu bakteriellen Regulatoren (Aravind & Koonin, 1999; Kyprides & Ouzounis, 1999). Die Wirkungsweisen einiger archaealer Repressoren wurden bereits gut untersucht, wie z. B. der MDR1-Repressor aus *Archaeoglobus fulgidus* oder der LrpA-Repressor aus *Pyrococcus furiosus* (Bell *et al.*, 1999; Hochheimer *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 2000 und 2002; Enoru-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Der bisher charakterisierte Transkriptionsaktivator GvpE aus dem halophilen Archaeon *Hb. salinarum* PHH1 und *Hf. mediterranei* ist an der Regulation der Gasvesikelproteine beteiligt (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Plöber & Pfeifer, 2002). Die Aminosäuresequenz des C-terminale Endes zeigt große Ähnlichkeit zu eukaryotischen Transkriptionsaktivatoren der Familie der basischen Leucizipper-Proteinen (bZIP) (Krüger *et al.*, 1998). DNA-Sequenzanalysen zeigen, dass GvpE sonst keine weiteren Ähnlichkeiten zu eukaryotischen Transkriptionsregulatoren besitzt (Kyprides & Ouzonis, 1999).

Archaeale Translation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Initiation der Translation am Beispiel der *gvp*-Gene untersucht. Wie auch die Transkription besitzt die Translation in Archaea gemeinsame Merkmale sowohl mit Bakterien als auch mit Eukaryonten (Tabelle 2). Eukaryonten benötigen für die Initiation der Translation eine Vielzahl von Initiationsfaktoren (eIFs), die meist aus vielen Untereinheiten aufgebaut sind (Pain, 1996; Clark *et al.*, 1996). Im Vergleich dazu benötigen Bakterien nur drei verschiedene Translationsinitiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 (Gualerzi & Pon, 1990). Ähnlich wie bei der Initiation der Transkription in Archaea werden für die Initiation der Translation mehrere Translationsinitiationsfaktoren verwendet, die homolog zu eukaryotischen Initiationsfaktoren sind (Tabelle 1) (Dennis, 1997; Bell & Jackson, 1998). So findet man in Archaea ein homologes Gen zum eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF-1A, dieser bindet an die freie 40S Untereinheit und

verhindert das vorzeitige Anlagern der 60S Untereinheit (Chaudhuri *et al.*, 1997; Pestova *et al.*, 1998).

Tab. 1 Eukaryotische Initiationsfaktoren und ihre Funktion, für die bei Archaea homologe Gene in den bereits bekannten Genomsequenzen identifiziert wurden.

Faktor	Funktion
eIF-1A	Fördert die Bindung der Met-tRNA _i an die 40S Untereinheit
eIF-2	GTP-Bindeprotein, bindet zusammen mit Met-tRNA _i an die 40S Untereinheit
eIF-2B	GTP-Austausch-Faktor, bewirkt den Austausch von GDP durch GTP an eIF-2
eIF-4A	RNA-abhängige ATPase, notwendig für die Bindung der mRNA ans Ribosom
eIF-5	Bewirkt die Hydrolyse von GTP, das zusammen mit eIF-2 an die 40S Untereinheit bindet

Auch die Gene, die für die α -, β - und γ -Untereinheiten des eIF-2 codieren, konnten in den Genomsequenzen nachgewiesen werden. In Eukaryonten bildet eIF-2 einen Komplex mit der Initiator-tRNA und GTP (Maitra *et al.*, 1982). Dieser ternäre Komplex bindet an die 40S Untereinheit zusammen mit einem weiteren Initiationsfaktor (eIF-2B) und bildet so den 43S Preinitiationskomplex, bevor im nächsten Schritt die mRNA an den Preinitiationskomplex gebunden wird. Der Translationsfaktor IF2 in Bakterien hat die gleiche Funktion wie der eukaryotische eIF-2, auch hier bildet IF2 einen ternären Komplex aus IF2, Initiator-tRNA und GTP. Strukturell und sequenziell besteht aber keine Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen. Während der bakterielle IF2 eine GTPase-Aktivität besitzt, die aktiviert wird, wenn sich die 50S Untereinheit anlagert, benötigt der eukaryotische eIF-2 als weiteren Initiationsfaktor eIF-5 (Severini *et al.*, 1991), der zusammen mit dem ternären Komplex an die 40S Untereinheit bindet (Chakrabarti & Maitra, 1991). Nachdem das Startcodon gefunden wurde, aktiviert eIF-5 eine GTPase-Aktivität, die vermutlich innerhalb des Komplexes liegt (Das *et al.*, 1997; Porse *et al.*, 1999; Uchiumi & Kominami, 1997). Nachdem GTP zu GDP hydrolysiert wurde und eIF-2-GDP von der 40S Untereinheit abdiffundiert ist, muss GDP durch GTP ausgetauscht werden, damit eIF-2 erneut einen ternären Komplex bestehend aus eIF-2, Initiator-tRNA und GTP bilden kann. Während der bakterielle IF2 eine eigene GDP→GTP Austausch-Domäne besitzt, benötigen Eukaryonten dazu den Initiationsfaktor eIF-2B (Price & Proud, 1994). In Archaea wurden bisher lediglich die Gene

für die α - und δ -Untereinheiten des eIF-2B gefunden, wobei die δ -Untereinheit für den GDP→GTP Austausch verantwortlich ist. Auch für den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF-4A wurde ein homologes Gen in Archaea gefunden. eIF-4A ist eine RNA-abhängige ATPase, die für das Binden der mRNA an den Preinitiationskomplex notwendig ist (Benne & Herhey, 1978). Andere eIF-4 Initiationsfaktoren wie eIF-4B, eIF-4E oder eIF-4G konnten bei Archaea bisher nicht nachgewiesen werden. Bei Eukaryonten sind die eIF-4 Initiationsfaktoren maßgeblich an der Erkennung der CAP-Struktur bestehend aus Methyl-7-Guanosin (m7G) am 5'-Ende der mRNA beteiligt. Die enge Verwandtschaft zwischen Archaea und Eukaryonten zeigt sich auch dadurch, dass beide als Initiator-tRNA Methionin verwenden, Bakterien hingegen verwenden N-Formylmethionin. Ähnlich wie bei Bakterien sind die mRNAs in Archaea häufig polycistronisch und besitzen keine CAP-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Neben AUG verwenden Archaea wie auch die Bakterien alternativ GUG und UUG als Startcodon (Tabelle 2).

Tab. 2 Vergleich der Translation bei Archaea mit der von Bakterien und Eukaryonten

	Bakterien	Archaea	Eukaryonten
Ribosome	70S	70S	80S
Initiationsfaktoren	IF1, IF2, IF3	>10 Initiationsfaktoren	>10 Initiationsfaktoren
Initiator-tRNA	N-formylmethionin	Methionin	Methionin
mRNA	polycistronisch	polycistronisch monocistronisch	monocistronisch
RNA-Erkennungselement	Shine-Dalgarno (SD) Sequenz	SD-Sequenz ?	CAP-Struktur <i>scanning</i> -Mechanismus

Während der Translationsapparat der Archaea ähnlich dem der Eukaryonten ist, so ist der Mechanismus der Initiation, d. h. das Auffinden des Startcodon eher vergleichbar mit dem bakteriellen Mechanismus. In Eukaryonten bindet der Preinitiationskomplex, bestehend aus der 40S ribosomalen Untereinheit, der Initiator-tRNA und verschiedenen Initiationsfaktoren, die mRNA über die CAP-Struktur am 5'-Ende (Banerjee, 1980). Das Ribosom wandert dann so lange auf der mRNA in 3'-Richtung entlang, bis das Startcodon gefunden wird (Kozak *et al.*, 1978 und 1989). Dieser Mechanismus wird als *scanning*-Mechanismus bezeichnet. Bakterien besitzen keine CAP-Struktur am 5'-Ende der mRNA. Die Erkennung der mRNA durch die ribosomale 30S Untereinheit erfolgt häufig mittels mRNA-rRNA-Wechselwirkung über eine purinreichen Sequenz in der Nähe des 3'-Endes der 16S rRNA und einer komplementären Sequenz (der so genannten Shine-Dalgarno-Sequenz) stromaufwärts des Startcodons im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) (Gualerzi & Pon, 1990; Shine &

Dalgarno, 1974; Kozak, 1983). Der Abstand zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) und Startcodon kann bei *E. coli* zwischen 5 und 13 nt variieren (Chen *et al.*, 1994). Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ribosome, denen die anti-SD-Sequenz der 16S rRNA fehlt, dennoch in der Lage sind, die Translation zu initiieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass mRNAs mit und ohne SD-Sequenz in der Lage sind, einen stabilen Komplex mit der 30S Untereinheit zu bilden (Melancon *et al.*, 1990; Calogero *et al.*, 1988).

Archaeale Gene besitzen häufig stromaufwärts des Startcodons ebenfalls eine purinreiche Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA und vergleichbar der bakteriellen SD-Sequenz ist (Dennis, 1997; Bell & Jackson, 1998; Watanabe *et al.*, 1997). Solche möglichen SD-Sequenzen findet man allerdings meist nur vor Genen innerhalb eines Operons, nicht aber vor dem ersten Gen eines Operons oder einzeln transkribierten Genen (Tolstrup *et al.*, 2000). *In vitro* Experimente mit Genen aus *Sulfolobus solfataricus* haben gezeigt, dass die Translation von mRNAs ohne SD-Sequenz im 5'-UTR nicht möglich ist, da die mRNA keinen stabilen Komplex mit der ribosomalen 30S Untereinheit bilden kann (Condò *et al.*, 1999; Moll *et al.*, 2002; Benelli *et al.*, 2003). Allerdings wird die *gvpA*-mRNA aus *Hb. salinarum*, die sowohl monocistronisch als *gvpA*, als auch polycistronisch als *gvpACNO*-Transkript gebildet wird und keine Ähnlichkeit zu einer möglichen SD-Sequenz im 20 nt lange mRNA-*leader* besitzt, in großen Mengen translatiert (Englert *et al.*, 1992a; Offner *et al.*, 1996). Wie die Translation von mRNAs ohne SD-Sequenz im 5'-UTR initiiert wird, ist bisher nicht bekannt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde bereits eine mögliche SD-Sequenz des p-*gvpG*-Gens untersucht (Sartorius-Neef, 2000). Dabei zeigte sich, dass die durch Punktmutationen veränderte SD-Sequenz, von 6 auf 4 Übereinstimmungen mit der komplementären Sequenz der 16S rRNA, zu weniger GvpG-Protein führte. Dies lieferte somit erste Hinweise darauf, dass die SD-Sequenz wichtig für eine effiziente Translation ist.

In silico Analysen und auch *in vivo* Daten zeigen, dass vielen archaealen Transkripten ein mRNA-*leader* fehlt, diese aber sehr effizient translatiert werden.

Solche *leader*-losen mRNAs findet man in allen drei Domänen des Lebens, wobei der Anteil *leader*-loser mRNAs in Archaea mit 30% am höchsten ist (Sensen *et al.*, 1996; Slupska *et al.*, 2001). Beispiele für halobakterielle *leader*-lose mRNAs sind die Transkripte des *brp*- und *bop*-Gens, die für Bakterioopsin und ein regulatorisches Protein kodieren (DasSarma, 1984; Betlach *et al.*, 1984) sowie das *fdx*-Gen und die monocistronische p-*gvpO*-mRNA aus *Hb. salinarum* (Pfeifer *et al.*, 1993; Offner *et al.*, 1996). *Leader*-lose mRNAs können, unabhängig vom Organismus aus dem sie stammen, sowohl von bakteriellen, archaealen und eukaryotischen Ribosomen erkannt und translatiert werden. Man nimmt daher an, dass die

Translation *leader-loser* mRNAs ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus ist, der nicht von mRNA-rRNA Wechselwirkung abhängt (O'Connor *et al.*, 1999; La Taena *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2001 und 2002; Grill *et al.*, 2000). In *E. coli* wurde gezeigt, dass *leader-lose* mRNAs durch das 70S Ribosom, an dem IF2 zusammen mit der Initiator-tRNA gebunden hat, erkannt werden und die Initiation der Translation durch das Startcodon über Codon-Anticodon-Wechselwirkung initiiert wird (Moll *et al.*, 2000 und 2004; O'Donnell & Janssen, 2002; Udagawa *et al.*, 2004). *In vitro* Studien mit einer *leader-lose* mRNA aus *Sulfolobus solfataricus* zeigten, dass die 30S Untereinheit nur dann einen stabilen Komplex mit der mRNA ausbilden kann, wenn zusätzlich die Initiator-tRNA vorhanden ist. Man nimmt daher an, dass die Erkennung der mRNA über eine Codon-Anticodon Wechselwirkung erfolgt (Benelli *et al.*, 2003).

Die Regulation der Genexpression ist nicht nur auf der Ebene der Transkription möglich, auch auf der Ebene der Translation wird die Proteinbiosynthese reguliert. Bei Eukaryonten erfolgt die Regulation der Translation häufig durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Translationsfaktoren. Als Beispiel sei der Initiationsfaktor eIF-2B erwähnt. Dieser besitzt im Zentrum des Proteins ein Serinrest, der durch eine Kinase phosphoryliert werden kann (Price & Proud, 1994). Über Phosphorylierung und Dephosphorylierung kann vermutlich die Aktivität von eIF-2B reguliert werden und dadurch letztlich auch die Translation. Eine weitere Möglichkeit ist die Blockierung der Initiation der Translation durch die Bindung eines Repressorproteins an eine Erkennungssequenz im 5'-UTR der mRNA. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation der Translation der Ferritin-mRNA und der ALA-Synthase im Eisen-Metabolismus (Casey *et al.*, 1988). Dabei bindet bei Mangel an Eisen ein Regulatorprotein an eine mRNA-Sekundärstruktur im 5'-UTR und verhindert die Translation, gleichzeitig wird dabei die mRNA-Stabilität erhöht. Ist wieder ausreichend Eisen vorhanden, schwächt die Bindung zwischen Regulator und mRNA ab und die mRNA kann wieder translatiert werden (Harrell *et al.*, 1991).

In Bakterien erfolgt die Regulation der Translation meist durch die Bildung von mRNA-Sekundärstrukturen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Regulation der Tryptophansynthese durch *attenuation*. Die translatierte *trp*-mRNA-*leader*-Region besitzt zwei aufeinander folgende Tryptophan-Codons. Bei einem Mangel an Tryptophan (d.h. von beladener tRNA^{Trp}) kommt die Translation an dieser Stelle zum Erliegen. Dadurch kann die mRNA eine Sekundärstruktur ausbilden, die die Fortsetzung der Transkription erleichtert. Bei einem Überschuss an Tryptophan, d.h. wenn genügend tRNA^{Trp} vorhanden ist, läuft die Translation zügig über die beiden Tryptophan-Codons weiter und führt schließlich zur Beendigung der Transkription (Babitzke, 1997). Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung einer Sekundärstruktur innerhalb des SD-Sequenz-Bereichs und/oder der Region des

Startcodons, wodurch die Translation blockiert wird. Auch über die RNA-Stabilität und/oder regulatorischen antisense-RNAs kann die Translation reguliert werden. Es gibt zwei Klassen von antisense-RNAs. Die meisten bekannten antisense-mRNAs werden in *cis* transkribiert, das heißt sie liegen in der gleichen Genregion wie die Ziel-mRNA, und sind vollständig komplementär zur Ziel-mRNA, andere werden in *trans* transkribiert und sind nicht vollständig komplementär zur Ziel-mRNA (Delihas, 1995). Zu dieser Klasse gehört beispielsweise *micF* und *dicF* aus *E. coli* (Babitzke, 1990). Unter Stressbedingungen reguliert die antisense-RNA *micF* die Expression von *ompF* posttranskriptional herunter, indem sie an den 5'-UTR der *ompF*-mRNA bindet. Dadurch wird die Translation verhindert und das Transkript destabilisiert (Andersen *et al.*, 1989; Andersen & Delihas, 1990). Die *dicF* antisense-RNA verhindert die Translation, indem sie die Shine-Dalgarno-Sequenz und das AUG-Startcodon der *ftsZ*-mRNA blockiert (Tetart & Bouché, 1992). Auch bei *Hb. salinarum* wurde ein ähnlicher Regulationsmechanismus beobachtet, so nimmt die Menge des p-*gvpFGHIJKLM* Transkripts ab, wenn der 5'-Bereich des p-*gvpD*-Gens stark exprimiert wird (Offner & Pfeifer, 1995). Innerhalb der mRNA-*leader* von p-*gvpD* und p-*gvpF* befindet sich ein zu 73% komplementärer Bereich von 19 nt (Offner & Pfeifer, 1995), wodurch eine Doppelstrang-RNA ausgebildet werden kann. Doppelsträngige RNA-Bereiche können von ds/ss-spezifischen RNAsen erkannt und degradiert werden.

Untersuchungen der Genregulation in halophilen Archaea

Für die Untersuchungen zur Genexpression steht für halophile Archaea bisher kein *in vitro* System zur Verfügung. Es stehen aber eine Reihe von Plasmidvektoren für *in vivo* Studien zur Verfügung. Diese besitzen neben einem Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli* einen weiteren Replikationsursprung für die Vermehrung in Halobakterien. Zusätzlich enthalten die Plasmidvektoren Antibiotikaresistenzgene zur Selektion. Der halobakterielle Expressionsvektor pJAS35 besitzt den Ferredoxin-Promotor aus *Hb. salinarum*, mit dessen Hilfe Gene ohne eigenen Promotor stark exprimiert werden können. Zur Selektion befindet sich auf dem Plasmid ein Resistenzgen für Novobiocin (Pfeifer *et al.*, 1994). Mit Hilfe des *shuttle*-Vektors pWL102, der ein Resistenzgen für Mevinolin besitzt, können Gene unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors exprimiert werden (Lam & Doolittle, 1989). Als Rezipient dient *Hf. volcanii* WFD11, da er leicht zu kultivieren und zu transformieren ist. *Hf. volcanii* besitzt selbst keine Gasvesikelgene und liefert somit einen sauberen genetischen Hintergrund, um Gasvesikelgene und ihre Expression mit Hilfe von Plasmidvektoren zu analysieren (Cline *et al.*, 1987; Lam & Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1994). Um die Regulation der Genexpression zu studieren, steht außerdem ein Reporter-gen

(*bgaH*) zur Verfügung, dass für ein halobakterielles Protein mit β -Galaktosidase-Aktivität aus *Hf. lucentense* kodiert (Holmes & Dyall-Smith, 2000). Die BgaH katalysiert analog zu LacZ (Familie 2 der Glycosylhydrolasen) die Hydrolyse von β -glykosidischen Bindungen wie beispielsweise in Laktulose ((β -D-Galaktopyranosyl- β -D-Fructofuranose) nicht aber in Laktose (β -D-Galaktopyranosyl-1-4- β -D-Glukopyranose) (Holmes *et al.*, 1997). Es können auch β -glykosidische Bindungen nicht natürlicher Substrate wie ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) oder X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktosid) hydrolysiert werden. Das Spaltprodukt ONP (ortho-Nitrophenolat), das bei der Hydrolyse von ONPG entsteht, kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm nachgewiesen werden. 5-Bromo-4-chloro-indigo aus der Hydrolyse von X-Gal ist als blauer Farbstoff sichtbar. Mit Hilfe des *bgaH*-Reportergens wurden bereits Promotorenstudien der verschiedenen *gvpA*-Promotoren durchgeführt (Gregor & Pfeifer, 2001). Mit Hilfe des Reportergens ist es auch möglich, die Initiation der Translation näher zu untersuchen, wobei jeweils nur der Bereich des zu untersuchenden Gens zwischen Transkriptionsstart und Translationsstart mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert wird und durch Mutationen verändert werden kann. Veränderungen in der BgaH-Aktivität können dann auf Veränderungen in der Proteinbiosynthese zurückgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Initiation der Translation halophiler Archaea am Beispiel von Genen des p-vac-Operons näher untersucht werden.

Es sollte zunächst die SD-Sequenz des p-*gvpH*-Gens näher untersucht werden, die eine gute Übereinstimmung zur möglichen SD-Sequenz in Halobakterien zeigt.

Hierzu sollte mittels Western-Analysen GvpH als Produkt untersucht werden. Für eine quantitativere Analyse sollte das *bgaH*-Gen als Reporter verwendet werden. Der 5'-UTR von *gvpH* sollte mittels einer *scanning*-Mutagenese durchmutiert, sowie der optimale Abstand zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon bestimmt werden. Auch sollte die Auswirkung einer vollständigen Deletion des 5'-UTR auf die Translation der *bgaH*-mRNA überprüft werden.

Ähnliche Analysen sollten auch am 5'-UTR der p-*gvpA*-mRNA, die keine mögliche SD-Sequenz zeigt, durchgeführt werden. Um die Bedeutung der Sequenz dieses 20 nt langen mRNA-*leaders* für die Translation und Transkriptstabilität zu ermitteln, sollten eine *scanning*-Mutagenese durchgeführt und Deletionen in den mRNA-*leader* eingeführt werden.

In einem weiteren Abschnitt sollten *leader*-lose und *leader*-haltige Transkripte untersucht werden. Durch Deletion des mRNA-*leaders* von verschiedenen p-vac-Genen sollte untersucht werden, welchen Einfluss der mRNA-*leader* auf die Initiation der Translation hat.

Material und Methoden

Material

Besondere Materialien und Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Hilfsmittel stammten von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Sigma und Serva. Von den Firmen Bacto, Difco und Oxoid stammten die Bestandteile der Medien. Restriktionsendonucleasen wurden von den Firmen Boehringer Ingelheim, MBI Fermentas, Eurogentec, New England Biolabs, Stratagene und USB bezogen.

Acrylamid (30% w/v)/Bisacrylamid (0,8% w/v)	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose SeaKem® ME	Seakem, Rockland
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Biodyne A Nylon-Transfermembran	Pall Cooperation
BioTrace Nitrocellulosemembran	Pall Cooperation
CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System	Gibco BRL, Eggenstein
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
Dap _{Goldstar} -Polymerase	Eurogentec, Seraing
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin DNA/RNA Labelling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL Detectionkit	Amersham Pharmacia, UK
Ethidiumbromid	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Gel Extraction Kit	Macherey- Nagel, Düren
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Lovastatin (Mevinolin-Derivat)	Geschenk von MDS Merck, Sharp & Dohm
N´N´N´N´-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Novobiocin	Sigma, St. Louis, USA
Nucleo Spin	Macherey-Nagel, Düren
Ortho-nitro-phenylgalaktopyranosid (ONPG)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG 600)	Sigma, St. Louis
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden

Röntgenfilme	Kodak, Rochester
SequiTherm EXCEL™ Sequencing Kit	BIOzym Diagnostik, Oldendorf
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
T3/T7 RNA Transcription Kit	Stratagene, La Jolla
T4 DNA-Ligase	Pharmacia, Upsala
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Serva, Heidelberg
Ultrafree-DA Kit	Millipore, Eschborn

Tab. 3 Synthetische Oligonukleotide

Name	Oligonukleotid-Sequenz ^a	Position
pHexNcoI-ClaI	GCAGGTCCATGGACAGATGATCGATCGCATG	3115-3145 ^a
pHexNcoI-EcoRI	CGGGTGATCCATGGCTGAATTCGTGCCTGT	3775-3746 ^a
pHSD7	GCCCATGGACAGATGATCGATCGCATCCTAAACCAGAAATAATGGT	3119-3164 ^a
pJAS	CGACACCCGGCGAGAGAGGT	
p-gvpH-bgaH(NcoI)	GTCCATGGCGTCGGGTACCATTATTTTC	3180-3145 ^a
SD1	GTTTTCGTCGGGTACCATTATTTCTTGACCTDDBVCGCATCG	3177-3136 ^a
SD2	GTTTTCGTCGGGTACCATTATTTCTTGACDVDDATGCGATCG	3177-3136 ^a
SD3	GTTTTCGTCGGGTACCATTATTTCTTGBDVCCATGCGATCG	3177-3136 ^a
SD4	GTTTTCGTCGGGTACCATTATTTCTVHBDCTCCATGCGATCG	3177-3136 ^a
SD0.1	GTCCATGGCGTCGGGTACCATTATTTCTTGACCTCCSVHGDATCG	3180-3136 ^a
SD5	GTCCATGGCGTCGGGTACCATTATVVDVTGACCTCCATGCGATCG	3180-3136 ^a
SD7	GTCCATGGCGTCGGGTACCATTATTTCTGGTTTAGGATGCGATCG	3180-3136 ^a
SD8	GTCCATGGCGTCGGGTACCATTATTTCTTACCTCCATGCGATCG	3180-3136 ^a
pJAS/(PstI)	GCCGAACCTGCGAGTGATGACAGTTGG	
3'-bgaH(PstI)2	CGAATTCCTGCAGCCCG	
H1	GCCCATGGACAGATGATCGATCGCATGGAGGTCAAATGG	3119-3176 ^a
H4	GCCCATGGACAGATGATCGATCGCATGGAGGTCAAATAATGG	3119-3176 ^a
H5	GCCCATGGACAGATGATCGATCGCATGGAGGTCAAATAATGG	3119-3176 ^a
H10	GCCCATGGACAGATGATCGATCGCATGGAGGTCAAGTATAAATAA	3119-3176 ^a
3'-bgaH	CGTCCCTCGCTCCGGTTCGATTCTGTCG	2507-2481 ^b
deltaSD(PstI)	GAACTCTGCGAGTGATGGTACCCGACGCC	
pA-Dlo-18	TAGTTAGAGATGATGGCGCAACC	94-126 ^b
pA-Dlu-18	GGTTGCGCCATCATCTCTAACTA	126-94 ^b
mutTL (3-7)rev.	AAGCCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGGATVBDDCATCTC	100-141 ^b
mutTL (6-10)rev.	AAGCCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTGGTGATCTGGHBVVABCCCATCTC	100-141 ^b
mutTL (9-14)rev.	AAGCCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTGGTGATDVHHHBTTAACCCATCTC	100-141 ^b
mutTL (14-18)rev.	AAGCCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTGGVHBVDGTTGTTAACCCATCTC	100-141 ^b
mutTL(17-21)rev.	AAGCCCATGGAATCTGGTTGCGCCATVHHVHATCTGGGTTAACCCATCTC	100-141 ^b
pA-XbaI ^{II}	CTCCGTACTAGAAGTACGAC	11-33 ^b

pGex A2 –Eco ^I	ATAGTATGAATTCCAAGCGATTACCTCCC	384-413 ^b
pA1-Nco ^{II}	CTGCCAAGCCCATGGAATCTGGTTG	155-131 ^b
p-5'D-Xba ^I	GGATGTGCTAGATTACACAGTCG	52-75 ^b
3`pD2-bgaH-Nco ^I	CCAACTGCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTACTTCTCTCC	
3`pD2ΔL-bgaH	CCAACTGCCATGGAATCTGGTTGCGCCATCTAAGAAGCTTTACACTCTCCG	
pF-Xba ^I	AGAACTGCCTAGAATCTCCGGCGGCTG	1998-2025 ^a
3`pF2-bgaH	CCAACTGCCATGGAATCTGGTTGCGCCATTGGTCTCTCTTC	
3`pF2ΔL-bgaH	CCAACTGCCATGGAATCTGGTTGCGCCATAAGTACACC	
pO-Xba ^I	GCGCGAAGATCTAGAATCCGCCATCG	2581-2606 ^a
3`pO2-bgaH	CCAACTGCCATGGAATCTGGTTGCGCCATCCCCTCGAACTGG	
5`pA+gvpE(1)	GTATAGTTAGAGATGATGGACGACTTGCTG	
5`pA+gvpE(2)	CAGCAAGTCGTCCATCATCTCTAACTATAC	
pE2 ^{II}	GATCTTCCTGTCTGCAGGTACCGTATGTGTATAGG	2309-2275 ^a
Universal	TTGTAAAACGACGGCCAGT**	622-640 ^c
Revers	CACACAGGAAACAGCTATGA**	800-819 ^c
pJAS_Sequenzp.	AGTCGAGGACGACTACGACG**	
bgaH_Sequenzp.	CGATTCCAGCCTCGGCCATC**	

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die Sequenzen sind in 5'→ 3' Richtung angegeben. kursiv geschriebene Sequenzen markieren künstlich eingefügte Restriktionschnittstellen, unterstrichene Nukleotide markieren eingeführte Mutationen in die p-vac-Sequenz; V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, D = A/G/T. ** Oligonukleotide mit 5'-Infrarot-Farbstoff-Modifikation für die DNA-Sequenzbestimmung. ^a Bindestelle innerhalb der p-gvpD-M-Sequenz (EMBL-Genbank accession number X55648). ^b Bindestelle innerhalb der p-gvpACNO-Sequenz (EMBL-Genbank accession number X64729). ^c Bindestelle innerhalb des Plasmidvektors pBluescript II SK(+) (Stratagene). ^I Oligonukleotid wurde von A. Hofacker zur Verfügung gestellt. ^{II} Oligonukleotid wurde von D. Gregor zur Verfügung gestellt.

Verwendete Organismen

<i>E. coli</i> Top10F ⁺	Invitrogen, USA
<i>E. coli</i> GM1674 (dam-)	Palmer & Marinus, 1994
<i>Haloferax volcanii</i> WFD11	Cline <i>et al.</i> , 1989

Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotika-Resistenzen)

pBluescript II SK(+) (Ampicillin)	Stratagene, La Jolla
pWL102 (Ampicillin, Mevinolin)	Lam & Doolittle, 1989
pJAS35 (Ampicillin, Novobiocin)	Pfeifer <i>et al.</i> , 1994; Soppa, nicht publiziert

Methoden

Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C in LB-Medium (Sambrook & Russel, 2001). Flüssigkulturen wurden bei 220 upm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Selektion auf Transformanten mit Ampicillin-Resistenz wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

Haloferax volcanii WFD11 wurde in Vollmedium (VM), dies enthielt 3 M NaCl (21,6% Salz), angezogen. Flüssigkulturen wurden aerob bei 37°C und 180 upm auf einem Schüttler, Kulturen auf festen Medien bei 42°C im Brutschrank, inkubiert. Zur Selektion auf Transformanten mit Mevinolin-Resistenz wurden 6 µg/ml Mevinolin zugegeben. Die Selektion auf Transformanten mit Novobiocin-Resistenz erfolgte durch Zugabe von 0,2 µg/ml Novobiocin.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente aus der p-vac-Region zu amplifizieren, wurde die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) angewandt. Mit dieser Methode war es möglich, zusätzliche Restriktionsschnittstellen und Mutationen in die Zielsequenz einzufügen. Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl in einem rechnergesteuerten Thermostaten (Hybaid Omni Gene, MWG-Biotech) durchgeführt. Im ersten Zyklus wurden die DNA-Stränge für 5 min bei 94°C denaturiert, die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize erfolgte je nach GC-Gehalt und der Länge der Oligonukleotide, die als Primer eingesetzt wurden, für 1 min bei 50-60°C. Die Polymerisierung erfolgte für 1 min pro kb zu polymerisierender DNA bei 72°C. Anschließend folgten 30 bis 35 identische Zyklen, wobei die Denaturierungszeit auf 15 sec reduziert wurde. In einem abschließenden Zyklus wurde die Polymerisationszeit auf 10 min erhöht, um alle Matrizenstränge nach Anlagerung der Primer vollständig zu verlängern.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

0,4 µl	DNA als Matrize
1/10 Volumen	10x Reaktionspuffer (ohne MgCl ₂)
6 µl	dNTP-Mix (2mM)
1-2 µl	MgCl ₂ (50 mM)
je 1 µl	Primer (20 pmol/µl)
0,4 µl	Dap _{Goldstar} -Polymerase
ad 50µl	doppelt deiononisiertes H ₂ O

Rekombinante PCR

Die Technik der rekombinanten PCR (Lottspeich & Zorbas, 1998) wurde, zur Deletion oder Fusion von DNA-Sequenzen angewandt. Die Zielsequenz wurde zunächst in zwei voneinander getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. Dazu wurden so genannte Mutationsprimer verwendet, welche die zu deletierende Sequenz ausschließen (Abbildung 3). Die beiden Mutationsprimer enthalten an ihrem 5'-Ende eine zueinander komplementäre Sequenz und binden im Abstand des zu deletierenden DNA-Stücks an der DNA. In einer weiteren PCR wurden die beiden ersten PCR-Amplifikate als Matrize zusammen mit den Randprimern eingesetzt. Die beiden ersten PCR-Amplifikate lagern sich an ihrem komplementären Ende aneinander, sodass sie verlängert werden können und die Zielsequenz mit Deletion entsteht (Abbildung 3).

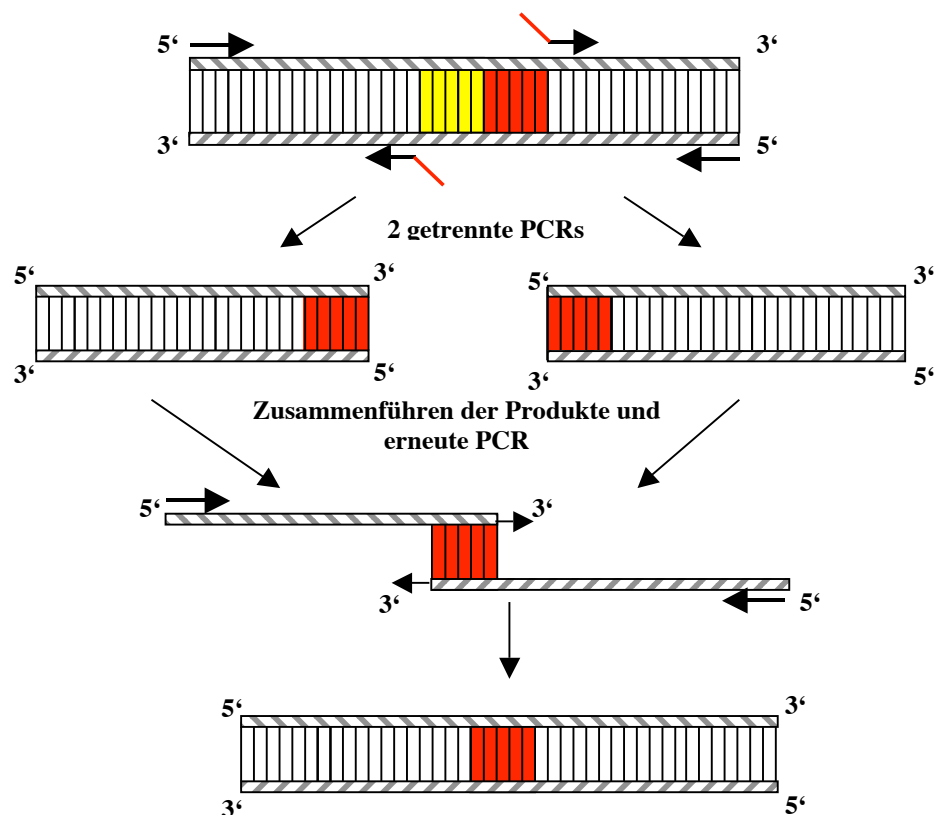


Abb. 3 Schematische Darstellung der rekombinanten PCR zur Deletion von DNA-Sequenzen. Die Randprimer sind als schwarze Pfeile dargestellt. Die internen Primer mit den komplementären 5'-Enden sind schwarz-rot dargestellt und die zu deletierende Sequenz gelb.

Für die Fusion von DNA-Fragmenten wurde ebenfalls die Rekombinante-PCR-Methode verwendet. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass die beiden Primer, die am Fusionsbereich binden, an ihren 5'-Enden komplementär zueinander sind. In einer weiteren PCR-Reaktion können dann die beiden Fragmente fusioniert werden, da sie an ihrem 3'-

Ende komplementär sind, nach dem gleichen Prinzip, wie bei der Deletion von DNA-Sequenzen (Abbildung 3).

Molekularbiologische Standardtechniken

Hydrolytische Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Dephosphorylierung von Vektoren erfolgte für 60 min bei 37°C, im Anschluss an die Restriktion. Zur Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase wurde 200 mM EDTA zugegeben und der Ansatz 10 min bei 65°C inkubiert. Die Entfernung der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch mit 1%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer; Sambrook & Russel, 2001). Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Inkubation mit Ethidiumbromid und Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm (Sambrook & Russel, 2001).

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde gemäß den Empfehlungen der entsprechenden Hersteller mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder alternativ mit dem Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. PCR-Fragmente, die als Matrize für weitere PCR-Amplifikationen benutzt wurden, wurden mit dem Ultrafree-DA-System für DNA-Extraktion (Millipore) aufgereinigt.

Für die Ligation wurden linearisierte Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:5 oder 1:10 an freien Enden zusammengegeben (Sambrook & Russel, 2001) und über Nacht bei 16°C mit T4-DNA-Ligase inkubiert.

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit kompetenten Zellen, die nach der RbCl₂-Methode (<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html>) hergestellt wurden. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch Hitzeschock der Zellen nach den gängigen Methoden (Sambrook & Russel, 2001).

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden Protokolle der Hersteller Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit), Macherey-Nagel (Nucleo Spin) und Gibco BRL (CONCERTTMRapid Plasmid Miniprep System) benutzt.

Molekularbiologische Standardtechniken, die hier nicht aufgeführt sind, wurden nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt.

Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzreaktion wurde mit dem *SequiTherm EXCEL II* Long-Read Sequencing Kit-LC (BIOzym) nach den Angaben des Herstellers in einem rechnergesteuerten Thermostaten (Robocycler Gradient 40, Stratagene) durchgeführt. Für die Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten im pBluescript II SK(+) Vektor wurden die 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotide Reverse und Universal (MWG) benutzt. Die DNA-Sequenzbestimmung von Fragmenten im pJAS35 Vektor erfolgte mit dem 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotid pJAS_Sequenzp. (MWG). Für die Sequenzbestimmung von DNA-Fusionsfragmenten mit dem *bgaH*-Leserahmen wurde vom 3'-Ende her der im *bgaH*-Leserahmen bindende, 5'-fluoreszenzmarkierte (IRD 800) Sequenzprimer *bgaH*_Sequenzp. (MWG) verwendet. Die Auftrennung und Detektion der Fragmente erfolgte mit einem LI-COR DNA Sequencer 4000 bei 1500 V, 35 mA und 50°C für 7 h. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware Image Analysis Version 4.0, LI-COR.

Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11

Vor der Transformation wurden die Plasmidkonstrukte durch *E. coli* GM1674 (*dam*⁻) (Palmer & Marinus, 1994) passagiert, um eine halobakterielle Restriktionsbarriere zu umgehen (Holmes *et al.*, 1991). Die Transformation von *Hf. volcanii* wurde nach dem Protokoll von Pfeifer & Ghahraman (1993) durchgeführt. Die Anwesenheit der jeweiligen Plasmidkonstrukte wurde durch Restriktionanalyse und falls erforderlich auch mit einer Southern-Analyse überprüft.

Konstrukte für die Transformation von *Hf. volcanii* WFD11

Die Oligonukleotide, die als Primer verwendet wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Als Matrize für die PCR wurde meist die p-vac-Region im Plasmid pWL102 verwendet (Offner & Pfeifer, 1995). Die Buchstaben V, B, H, und D in der DNA-Sequenz stehen für die alternativen Basen: V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T und D = A/G/T

Subfragmente der p-vac-Region in pWL102

pA-gvpA

das 381 bp *Xba*-*EcoRI*-Subfragment wurde mit den beiden Primern pAXbal/pGex A2-Eco, mit der p-vac-Region in pWL102 als Matrize, hergestellt.

AΔTL-gvpA

das 375 bp große *Xba-EcoRI*-Fragment enthält eine Deletion von 6 Nukleotiden (Position 112-117). Es wurde bereits während meiner Diplomarbeit hergestellt und ist dort auch beschrieben (Diplomarbeit Sartorius-Neef, 2000).

AΔL-gvpA

bei dem 362 bp große *XbaI-EcoRI*-Fragment wurde der 20 nt lange *p-gvpA*-mRNA-*leader* (Position 106-124) deletiert, der Transkriptionsstart liegt somit ein Nukleotid stromaufwärts des Startcodons (folglich wurden 19 nt deletiert). Das Fragment wurde mit Hilfe der rekombinanten PCR hergestellt. Der Randprimer pAXbal lieferte mit dem Mutationsprimer pA-Dlu-18 zunächst ein 95 bp Fragment, der Mutationsprimer pA-Dlo-18 mit dem zweiten Randprimer pGex A2-Eco ein 301 bp Fragment, als Matrize wurde jeweils die *p-vac*-Region verwendet. In einer weiteren PCR wurden die beiden ersten Amplifikate als Matrize zusammen mit den beiden Randprimern verwendet. Das so amplifizierte 384 bp Fragment enthält den *p-gvpA*-Leserahmen mit der P_A -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart ohne den mRNA-*leader*.

P_A-gvpE

bei dem 710 bp große *XbaI-Acc65I*-Fragment wurde der P_A -Promotor mit dem *p-gvpE*-Leserahmen fusioniert. Das Fragment wurde mit Hilfe der rekombinanten PCR hergestellt. Der Randprimer pAXbal lieferte mit dem internen Primer 5'pA+gvpE(2) zunächst ein 110 bp Fragment, der zweite interne Primer 5'pA+gvpE(1) mit dem zweiten Randprimer pE2 ein 630 bp Fragment, als Matrize wurde jeweils die *p-vac*-Region verwendet. In einer weiteren PCR wurden die beiden ersten Amplifikate als Matrize zusammen mit den beiden Randprimern verwendet. Dass so amplifizierte 710 bp Fragment enthält die P_A -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart fusioniert mit dem *p-gvpE*-Leserahmen.

Subfragmente der *p-vac*-Region im Expressionsvektor pJAS35***pE^{Ex}***

enthält das 599 bp große *NcoI-Acc65I*-Konstrukt mit *p-gvpE* im Expressionsvektor pJAS35 (Gregor & Pfeifer, 2001)

cE^{Ex}

wurde nur als Kontrolle verwendet und war bereits vorhanden (Krüger *et al.*, 1998)

mcE^{Ex}

wurde nur als Kontrolle verwendet und war bereits vorhanden (Gregor & Pfeifer, 2001).

G-M

das G-M-Konstrukt, welches lediglich als Kontrolle verwendet wurde, wurde bereits von S. Offner hergestellt und publiziert (Offner & Pfeifer, 1995)

H

das 645 bp große *NcoI*-Fragment wurde mit pHexNcoI-ClaI/pHexNcoI-EcoRI als Primer mittels PCR amplifiziert, als Matrize wurde die p-vac-Region verwendet.

SD7H

enthält das 645 bp große *NcoI*-Fragment und wurde wie das H-Konstrukt hergestellt, jedoch mit pHSD7 und pHexNcoI-EcoRI als Oligonukleotide.

bgaH-Fusionskonstrukte in pJAS35**H-bgaH**

enthält das Fusionskonstrukt aus dem 56 bp *NcoI* p-gvpH-leader (5'-UTR) Fragment (Position 3122-3177) und dem 2203 bp *NcoI*-BamHI-bgaH-Fragment (Position 2362-4563) im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 inseriert. Offene Leserahmen werden im pJAS35 unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors (P_{fdx}) exprimiert. Das *NcoI*-p-gvpH-leader-Fragment wurde mit den Oligonukleotiden pJAS/p-gvpH-bgaH(*NcoI*) amplifiziert, als Matrize wurde das H-Konstrukt verwendet. Das Fragment wurde als *NcoI*-Fragment in das pJAS35-bgaH-Konstrukt inseriert (Gregor & Pfeifer, 2001), welches bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt.

Mutanten SD0, SD5, SD7 und SD8

enthalten jeweils die gleichen 56 bp großen *NcoI*-Fusionskonstrukte wie H, allerdings wurden jeweils Basen mit Hilfe von degenerierten Primern substituiert. Die Primer wurden jeweils so konstruiert, dass die zu substituierenden Basen beliebig durch eine der drei anderen Basen ausgetauscht wurden. Als 5'-Primer wurde immer pJAS verwendet. Für das Fragment SD0 bzw. SD5, SD7 und SD8 wurden als 3'-Primer SD0.1 bzw. SD5, SD7 und SD8 verwendet. Bei dem Fragment SD0 wurden die Basen an Position 3141-3144 (GCAT→HDBV) ausgetauscht, bei SD5 an Position 3153-3156 (AGAA→BHBB), bei SD7 an Position 3145-3150, 3152 (GGAGGTCA→CCTAAACC) und bei SD8 an Position 3151 (C→G). Als Matrize

für die PCR wurde das H-Konstrukt verwendet. Die Fragmente wurden jeweils als *NcoI*-Fragmente in das pJAS35-*bgaH*-Konstrukt inseriert (Gregor & Pfeifer, 2001).

Mutanten SD1, SD2, SD3 und SD4

enthalten ebenfalls jeweils das 56 bp große *NcoI*-Fusionskonstrukt mit verschiedenen Basensubstitutionen. Die Fragmente wurden mittels PCR in zwei Schritten hergestellt. Im ersten PCR-Schritt wurden die Primer pJAS/SD1 bzw. SD2, SD3, SD4 verwendet. Mit Hilfe des Primers SD1 wurden die Basen an Position 3143-3146 (TACG→VBDH) substituiert, mit SD2 an Position 3145-3148 (GGAG→HHBH), mit SD3 an Position 3147-3150 (AGGT→BHHV) und mit SD4 an Position 3149-3152 (GTCA→HVDB). Als Matrize wurde das H-Konstrukt verwendet. In der zweiten PCR wurden die jeweiligen Amplifikate aus der ersten PCR als Matrize verwendet, sowie die beiden Oligonukleotide pJAS/p-gvpH-*bgaH*(*NcoI*), sodass zusätzlich am 3'-Ende eine weitere *NcoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Die erhaltenen Amplifikate wurden als *NcoI*-Fragment in das pJAS35-*bgaH*-Konstrukt inseriert (Gregor & Pfeifer, 2001).

Δlead

enthält das 2234 bp *PstI*-*bgaH*-Fragment (Position 2364-4563). Für die PCR wurden die Oligonukleotide pJAS/(*PstI*)/3'-*bgaH*(*PstI*)2 verwendet. Das *PstI*-Fragment wurde in den pJAS35 Vektor inseriert. Als Matrize wurde das *bgaH*-pBlueskript II SK(+)-Konstrukt verwendet (Gregor & Pfeifer, 2001).

ΔSD

enthält das 2249 bp *PstI*-*bgaH*-Fusionskonstrukt bestehend aus den ersten 5 Codons des p-*gvpH*-Leserahmens (Position 3160-3174) und dem 2203 bp *NcoI*-*Bam*HI-*bgaH*-Fragment (Position 2362-4563). Für die PCR wurden die Oligonukleotide deltaSD(*PstI*)/3'-*bgaH*(*PstI*)2 verwendet. Das *PstI*-Fragment wurde in den pJAS35 Vektor inseriert. Als Matrize wurde das Δlead-Konstrukt verwendet.

Mutanten H1, H4, H5 und H10

enthalten verschiedene H-*bgaH*-Fusionskonstrukte, wobei der Abstand der Shine-Dalgarno Sequenz zum Startcodon variiert. Als Oligonukleotide für die PCR wurden als 5'-Primer H1 bzw. H4, H5 und H10 verwendet sowie als 3'-Primer 3'-*bgaH*. Das H-Konstrukt wurde als Matrize verwendet. Die Fragmente wurden als *NcoI*-Fragmente in das pJAS35-*bgaH*-Konstrukt (Gregor & Pfeifer, 2001), welches den *bgaH*-Leserahmen enthält, inseriert. Mit Hilfe des Primers H1 wurden die Basen an Position 3154-3159 deletiert, H4 an Position

3153-3155, H5 an Position 3154-3155, mit Hilfe des Primers H10 wurden hinter Position 3154 drei Nukleotide (TAT) inseriert.

bgaH-Fusionskonstrukte in pWL102

A-*bgaH*

enthält das 125 bp *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment (Position 21-145) und dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pWL102 (Gregor & Pfeifer, 2001).

Δ TL_A-*bgaH*

enthält das 119 bp *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment (Position 21-145), wobei sechs Nukleotide an Position 112-117 deletiert wurden. Als Oligonukleotide wurden pA-*XbaI*/pA1-*NcoI* verwendet, als Matrize das Δ TL-Konstrukt. Das *XbaI-NcoI*- Δ TL_A-Promotor-Fragment wurde in das pBluescript II SK(+) pA-*bgaH*-Konstrukt inseriert, wobei das *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment zuvor entfernt wurde.

Δ L_A-*bgaH*

enthält das 106 bp *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment (Position 21-145), wobei der mRNA-*leader* (Position 106-124) deletiert wurde. Lediglich der Transkriptionsstart wurde beibehalten, sodass dieser nun ein Nukleotid stromaufwärts des Startcodons liegt. Die PCR wurde wie bei Δ TL_A durchgeführt, als Matrize diente Δ L. Als Oligonukleotide wurde pA-*XbaI* und pA1-*NcoI* verwendet. Das PCR-Produkt wurde als *XbaI-BamHI*-Fragment in das Bluescript II SK(+) pA-*bgaH*-Konstrukt inseriert, wobei das *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment zuvor entfernt wurde.

***scanning*-Mutagenese des p-*gvpA*-mRNA-*leaders* (pA-mTL-A bis E-Mutanten)**

pA-mTL-mRNA-*leader*-Mutanten (mTL A-E) enthalten jeweils eine Substitution von 5 oder 6 Nukleotiden stromaufwärts des AUG-Startcodons. Als Mutationsprimer wurden degenerierte Oligonukleotide verwendet, sodass die zu substituierende Base beliebig durch eine der drei anderen Basen ausgetauscht wurde. Die einzelnen Fragmente wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden pA-*XbaI* und dem jeweiligen Mutationsprimer mutTL(3-7), mutTL(6-10), mutTL(9-14), mutTL(14-18) bzw. mutTL(17-21) hergestellt. Die 126 bp *XbaI-NcoI*-mTL-Fragmente wurden jeweils in das Bluescript II SK(+) A-*bgaH*-Konstrukt inseriert, wobei das *XbaI-NcoI* P_A-Promotor-Fragment zuvor entfernt wurde. Die mTL-A-Mutanten enthalten Basensubstitutionen an Position 120-124 (CACCA→DBDDB), mTL-B an Position 117-121

(GATCA→HBVDB), mTL-C an Position 112-117 (TCCCAG→VDDDBH), mTL-D an Position 109-113 (TAATC→VBBVD) und mTL-E an Position 106-110 (GGTTA→HHVVB).

pD

Enthält das 169 bp *XbaI-NcoI* P_D-Promotorfragment (pD Position 1-100 + 7-67) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (*bgaH*-Leserahmen, Position 2362-4564) in pWL102 (Hofacker *et al.*, 2004).

D-*bgaH*

enthält das 143 bp *XbaI-NcoI* P_D-Promotorfragment (pD, Position 1-85 + 7-67), sowie die ersten 6 AS des p-*gvpA*-Leserahmens (Position 125-142) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2362-4563) in pWL102. Für die Amplifikation mittels PCR wurden die Oligonukleotide p-5'D-*XbaI* und 3'pD2-*bgaH-NcoI* verwendet, als Matrize pD in pWL102.

ΔL_D-*bgaH*

enthält das 72 bp *XbaI-NcoI* P_D-Promotorfragment (pD, Position 1-85 + 7-67) mit einer Deletion des mRNA-*leaders* (Position 12-82), sowie die ersten 6 AS des p-*gvpA*-Leserahmens (Position 125-142) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pWL102. Als Oligonukleotide für die PCR wurden p-5'D-*XbaI* und 3'pD2ΔL-*bgaH* verwendet, als Matrize pD.

pF

Enthält das 275 bp *XbaI-NcoI* P_F-Promotorfragment (pF, Position 2007-2281) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (*bgaH*-Leserahmen, Position 2362-4564) und war bereits vorhanden (Hofacker *et al.*, 2004).

F-*bgaH*

enthält das 257 bp *XbaI-NcoI* P_F-Promotorfragment (pF, Position 1998-2263), sowie die ersten 6 AS des p-*gvpA*-Leserahmens (Position 125-142) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pWL102. Für die PCR wurden pF-*XbaI* und 3'pF2-*bgaH* als Oligonukleotide verwendet, als Matrize diente pF.

ΔL_F-*bgaH*

enthält das 88 bp *XbaI-NcoI* P_F-Promotorfragment (pF, Position 1998-2263) mit einer Deletion des mRNA-*leaders* (Position 2094-2263), sowie die ersten 6 AS des p-*gvpA*-

Leserahmens (Position 125-142) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pWL102. Als Oligonukleotide für die PCR wurden pF-XbaI und 3'pF2ΔL-bgaH verwendet und pF als Matrize.

pO

Enthält das 84 bp *XbaI-NcoI* P_O-Promotorfragment (pO, Position 2591-2674) zusammen mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (*bgaH*-Leserahmen, Position 2362-4564) und war bereits vorhanden (Hofacker *et al.*, 2004).

O-bgaH

enthält das 66 bp *XbaI-NcoI* P_O-Promotorfragment (pO, Position 2581-2656), sowie die ersten 6 AS des p-*gvpA*-Leserahmens (Position 125-142) mit dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR Produkt von Position 2356-4571) in pWL102. Als Oligonukleotide wurden pO-XbaI und 3'pO2-bgaH verwendet, als Matrize pO.

Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *Hf. volcanii* WFD11 wurde mit dem CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco BRL, Eggenstein) oder NucleoSpin (Macherey-Nagel) durchgeführt. Für die Isolierung wurden 3 ml einer stationären Halobakterienkultur abzentrifugiert und die Zellen in 250 µl Halobakterien-Resuspendierungspuffer (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, 1 M NaCl) aufgenommen. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

Southern-Analyse

Für die Detektion spezifischer DNA-Sequenzen mittels Southern-Analyse wurden die entsprechenden Plasmidkonstrukte zunächst hydrolytisch gespalten und über 1%ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur partiellen Depurinierung wurde das Agarosegel 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt, zum Denaturieren 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und abschließend zum Neutralisieren 30 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl pH 7,5. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Southern, 1975; Sambrook & Russel, 2001). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden entweder durch zweistündige Inkubation bei 80°C fixiert, oder durch UV-crosslink. Für die Detektion wurden Digoxigenin markierte DNA-Fragmente verwendet. Die Herstellung der DNA-Sonden sowie die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem DIG DNA Labelling Kit und dem DIG

Luminescent Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase 15 ml Flüssigkultur ($OD_{600} = 0,2$ bis $0,6$) und aus der stationären Wachstumsphase 6 ml Flüssigkultur (OD_{600} 1,8 bis 2,1) abzentrifugiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* erfolgte nach der Single-Step Methode von Chomczynski & Sacchi (1987), in leicht abgewandelter Form. Nach der ersten Fällung der RNA wurde ein zweiter Phenol/Chloroform-Extraktionsschritt durchgeführt. Nach der abschließenden Isopropanol-Fällung wurde das RNA-Präzipitat mit 70% eiskaltem Ethanol (in DEPC-behandeltem deionisiertem Wasser) gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 μ l DEPC-behandeltem, deionisierten Wasser resuspendiert.

Zur Prüfung der Qualität der RNA anhand der Schärfe der 16S und 23S Banden wurde ein Aliquot von 2 μ l der RNA-Probe mit 8 μ l denaturierendem RNA-Mix (250 μ l deionisiertes Formamid, 83 μ l 37%iger Formaldehyd, 50 μ l 1x MOPS-Gelpuffer pH 8,0, 1 μ l 10x DNA-Auftragspuffer) gemischt, 10 min bei 65°C denaturiert und elektrophoretisch über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt. Zum Sichtbarmachen der 16S und 23S rRNA-Banden wurde das Agarosegel mit Toluidinblau (0,1% Toluidin, 20% (v/v) Ethanol in doppelt deionisiertem H₂O) fünf Minuten gefärbt und anschließend mit 20% Ethanol entfärbt.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt, indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Konzentration nach der Formel, dass 25 OD-Einheiten einer Konzentration von 1 mg/ml RNA entspricht, berechnet.

Northern-Analyse

Für die Northern-Analyse wurden 5 μ g Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* in denaturierenden, formaldehydhaltigen, 1,2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen transferiert (Ausubel *et al.*, 1988). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) eingesetzt. Die auf die Nylonmembran transferierte RNA wurde durch zweistündige Inkubation bei 80°C bzw. durch UV-crosslink fixiert. Um die Qualität und Quantität der RNA anhand der Bandenschärfe zu beurteilen, wurde die Membran mit Methylenblau (0,04% (w/v) Methylenblau, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5) angefärbt und anschließend mit deionisiertem H₂O entfärbt.

Die Detektion bestimmter RNA-Fragmente wurde mit strangspezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt, die mit dem DIG RNA Labelling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach dem T3/T7 Polymerase-System von Stratagene hergestellt

wurden. Dazu wurden Konstrukte benutzt, die bestimmte p-vac Sequenzen im Plasmidvektor pBluescript II SK(+) enthielten.

Herstellung strangspezifische Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Für die Herstellung der strangspezifischen RNA-Sonden wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet.

A-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit der *gvpA*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 362 bp *XbaI-EcoRI*-Fragment mit p-*gvpA* in pBluescript II SK(+) enthält (Diplomarbeit Sartorius-Neef, 2000).

H-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit der *gvpH*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 645 bp *NcoI*-Fragment mit p-*gvpH* in pBluescript II SK(+) enthält.

bgaH-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit der *bgaH*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 2,2 kb großes *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment in pBluescript II SK(+) enthält (Gregor & Pfeifer, 2001).

E-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit der *gvpE*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 599 bp *NcoI-Acc65I*-Fragment mit p-*gvpE* in pBluescript II SK(+) enthält (Gregor & Pfeifer, 2001).

Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte wie bei Ausubel *et al.*, (1988) beschrieben. Die Hybridisierungslösung enthielt jedoch zusätzlich 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS und 0,5% Magermilchpulver. Die Vorhybridisierung erfolgte für 2-4 h bei 42°C. Die RNA-Sonde wurde in Hybridisierungslösung aufgenommen und zunächst 10 min bei 65°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 42°C über Nacht. Die Membran wurde mit 0,2x SSC, 0,1% SDS für 20 min bei 55°C und jeweils 30 min mit der gleichen Lösung bei 60°C und 65°C gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

Isolierung von halobakteriellen Proteinen für Western-Analysen

Für die Isolierung der löslichen Fraktion der Gesamtproteine wurden von einer *Haloferax volcanii* Kultur aus der exponentiellen und frühstationären Wachstumsphase 4,5 ml Kultur entnommen und bei 12000 g für 3 min abzentrifugiert. Zur Zellyse wurde das Zellsediment in 400 μ l TE-Puffer mit 0,5 ml DNaseI (1 mg/ml) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde über Nacht gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,2 bei 4°C dialysiert. Die Zellmembran sowie andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4°C von der löslichen Fraktion, die die Proteine enthält, abgetrennt. Die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bradford-Tests (Ausubel *et al.*, 1988) bestimmt, dazu wurden 20 μ l einer 1:10 verdünnten Proteinlösung in einer Halbmikroküvette mit 980 μ l Bradfordreagenz, bestehen aus 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 8,5% (v/v) Phosphorsäure und 4,75% (v/v) EtOH, gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm die Extinktion bestimmt und mit Hilfe einer Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) von 0,1-1,0 mg/ml Protein die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung der Proteine wurden 12-16%ige Polyacrylamidgele nach Schagger (Schagger & von Jagow, 1987) verwendet. 20-40 μ g Gesamtprotein wurden vor dem Auftragen mit 3x SDS-Probenpuffer (0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 4% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt und für 1 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 2-3 h bei 110 V.

Western-Analyse

Die über SDS-Polyacrylamidgele elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Nassblot (Midget Multiblot-System, Pharmacia) nach dem von Towbin *et al.* (1979) beschriebenen Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 4°C und 100 V. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% Methanol. Um den Transfer der Proteine zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Rot-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau-Rot S, 3% (w/v) Trichloressigsäure, 3% (w/v) Sulfosalicylsäure) angefärbt. Die Banden des Proteinstandards wurden mit Bleistift auf der Nitrozellulosemembran markiert und diese anschließend mit deionisiertem H₂O entfärbt.

Proteindetektion durch Chemilumineszenz

Die Proteindetektion durch Chemilumineszenz erfolgte mit dem ECL-System von Amersham (Amersham Pharmacia, UK) nach den Angaben des Herstellers. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei Zimmertemperatur in Blockierungspuffer (1-2% Magermilchpulver oder BSA, 0,05-0,1% Tween-20 in PBS-Puffer) inkubiert. PBS-Puffer enthielt 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,2 mM Na₂HPO₄ und 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4. Die jeweils entsprechenden Antiseren aus Kaninchen reagieren mit bestimmten halobakteriellen Proteinen und wurden 1:500 bzw. 1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer 1 h mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Membran für 10 min in Blockierungspuffer wurden unspezifisch mit anderen Proteinen reagierende Antikörper entfernt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper aus Esel in einer 1: 5000 Verdünnung, der spezifisch mit IgG aus Kaninchen reagiert und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran für 10 min in Blockierungspuffer wurde die Membran 1 min mit der Chemilumineszenzlösung inkubiert und mit einem Röntgenfilm in verschiedenen Zeitintervallen (1-60 min) exponiert.

Folgende Antiseren wurden in dieser Arbeit für Western-Analysen verwendet:

Antiserum	benutzt zur Detektion von	produziert in	Referenz
Anti-mc-Gasvesikel	pGvpA	Kaninchen	Englert & Pfeifer, 1993
Anti-mcGvpE	pGvpE	Kaninchen	Zimmermann & Pfeifer, 2003
Anti-cGvpE	pGvpE	Kaninchen	Krüger & Pfeifer, 1996
Anti-pGvpH	pGvpH	Kaninchen	Hofacker & Pfeifer, unveröffentlicht

Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität der BgaH

X-Gal-Test

Von auf Agarplatten ausgestrichenen *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten kann die β -Galaktosidase-Aktivität der BgaH durch besprühen mit X-Gal (5-Brom-4-chloro-indoyl- β -D-galaktosid) sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die Agarplatten mit X-Gal (10 mg/ml in Dimethylformamid) besprüht und über Nacht bei 42°C inkubiert. Kolonien mit β -Galaktosidase-Aktivität färbten sich blau, die ohne nachweisbare Enzymaktivität blieben rot-orange.

ONPG-Test

Die β -Galaktosidase-Aktivität in Zelllysaten von *Haloferax volcanii* WFD11-Transformanten wurde mit dem ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid)-Test entsprechend dem Protokoll von Holmes *et al.* (1997) ermittelt. Die Transformanten wurden hierfür in 3 M *Hf. volcanii* Vollmedium mit Mevinolin (6 μ g/ml) und/oder Novobiocin (0,2 μ g/ml) bei 37°C und 180 upm angezogen. Für den Enzymtest wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 100 μ l Kultur entnommen (bzw. 1000 μ l in der frühexponentiellen Wachstumsphase, wobei die Kultur für 3 min bei 12000 g abzentrifugiert wurde und das Zellsediment in 100 μ l Vollmedium resuspendiert wurde). Zu den resuspendierten Zellen wurden 800 μ l ONPG-Testpuffer (2,5 M NaCl, 10 μ M MnCl_2 , 0,1% β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2), zur Zellyse 50 μ l 2% Triton X-100 zugegeben und 50 μ l ONPG-Stammlösung (8 mg/ml ONPG in 0,1 M Tris-HCl pH 7,2). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die enzymatische Reaktion als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta A/\Delta t$) photometrisch bei 405 nm verfolgt. Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz kann die Volumenaktivität als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in 1 ml berechnet werden.

Lambert-Beersche Gesetz:
$$\frac{dA}{dt} = \varepsilon * d * \frac{dc}{dt}$$

A = Absorption

ε = molare Absorptionkoeffizient [$\text{l} * \text{cm}^{-1} * \text{mol}^{-1}$]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = Konzentration [$\text{mol} * \text{l}^{-1}$]

Der molare Extinktionskoeffizient ε für das Produkt o-Nitrophenol aus der β -glykosidischen Spaltung von ONPG beträgt bei 405 nm $3,3 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Eine Einheit (Unit) der β -Galaktosidase-Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die die Hydrolyse von 1 μ mol ONPG pro min katalysiert. Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität [U/mg] ist definiert als der Quotient aus den Einheiten der β -Galaktosidase-Aktivität pro mg Gesamtprotein.

Der Proteingehalt jeder Probe wurde mittels Bradford bestimmt, in leicht abgewandelter Form: Die Zellen aus 100 μ l bzw. 1000 μ l Kultur wurden in 100 μ l TED-Puffer (1 μ g/ml DNaseI in TE) resuspendiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und 20 μ l jeweils in den Bradford-Test eingesetzt.

Ergebnisse

Die meisten archaealen Gene besitzen stromaufwärts des Startcodons eine purinreiche Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist (Tolstrup *et al.*, 2000). Es gibt aber auch Gene, die in ihrem mRNA-*leader* keine SD-Sequenz besitzen, wie zum Beispiel das *gvpA*-Gen, das für das Hauptstrukturprotein der Gasvesikel in *Hb. salinarum* codiert. *Leader*-lose mRNAs findet man in allen drei Domänen des Lebens, wobei der Anteil in Archaea (30% in hyperthermophilen Archaea) am höchsten ist (Sensen *et al.*, 1996; Slupska *et al.*, 2001). Beispiele für halobakterielle *leader*-lose mRNAs sind die Transkripte des *brp* und *bop*-Gens, die für Bakterioopsin und ein regulatorisches Protein kodieren (DasSarma, 1984; Betlach *et al.*, 1984) sowie das *fdx*-Gen und die monocistronische p-*gvpO*-mRNA aus *Hb. salinarum* (Pfeifer *et al.*, 1993; Offner *et al.*, 1996).

Ziel dieser Arbeit war es über 1.) *in vivo* Experimente die Funktion potentieller SD-Sequenzen in halophilen Archaea bei der Initiation der Translation zu untersuchen, 2.) sollte der mRNA-*leader* des p-*gvpA*-Gens, der keine potentielle SD-Sequenz enthält, näher untersucht werden und 3.) sollte die Translation von *leader*-losen mRNAs näher untersucht werden.

1. Untersuchung der potentiellen SD-Sequenz vor dem p-*gvpH*-Gen

Für die *in vivo* Untersuchungen zur Funktion möglicher SD-Sequenzen bei der Translation, wurden die einzelnen Gene der p-vac-Region aus *Halobacterium salinarum* PHH1 verwendet (Abbildung 4). Die 14 an der Gasvesikelsynthese beteiligten *gvp*-Gene sind in der p-vac-Region auf dem Plasmid pHH1 lokalisiert (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). Mit Ausnahme von p-*gvpA* und p-*gvpO* besitzen alle *gvp*-Gene stromaufwärts vom Startcodon eine 4 bis 8 nt lange, purinreiche Sequenz, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist. Ähnlich wie bei Bakterien könnte die kleine ribosomale Untereinheit die mRNA über diese purinreiche Sequenz (SD-Sequenz) durch mRNA-rRNA-Wechselwirkung erkennen und die Translation initiieren. Die SD-Sequenz befindet sich jeweils in einem Abstand von 3 bis 7 nt stromaufwärts des AUG-Startcodons (Abbildung 4). Die Identität zur 8 nt langen Sequenz GGAGGUGA, die am 3'-Ende der 16S rRNA von *Halobacterium salinarum* (Hui & Dennis, 1985; Mankin & Kagramanova, 1986) und *Haloferax volcanii* (Gupta *et al.*, 1983) liegt, variiert von 4 nt bis hin zur vollständigen Übereinstimmung (Abbildung 4). Für die Untersuchung der SD-Sequenz wurde das p-*gvpH*-Gen verwendet, da die SD-Sequenz mit 7

nt mit der Consensus-Sequenz der 16S rRNA Übereinstimmt und bereits ein Antiserum gegen GvpH vorhanden ist (Hofacker & Pfeifer, unveröffentlicht). Zur Quantifizierung des translatierten Genproduktes, wurde der Leserahmen des *bgaH*-Gens als Reporter an den 5'-untranslatierten Bereich des *gvpH*-Gens fusioniert (Holmes & Dyll-Smith, 2000).

SD-Sequenz:	<u>GGAGGUGA</u>	Abstand zum AUG
<i>gvpO</i> *	CGGGGUCUCUACAUAGAAGC AUGGCU	-
<i>gvpN</i>	CUUCGGCC <u>GGAUGAU</u> AAAAC AUGACG	4 nt
<i>gvpC</i>	UCACAGACAAA <u>CGCGA</u> CGAG AUGAGU	4 nt
<i>gvpA</i> *	GGGUUAAUCCAGAUACCA AUGGCG	-
<i>gvpD</i> *	CCAUCGACU <u>GGAGAGA</u> AGUA AUGAGU	3 nt
<i>gvpE</i>	CUCAC <u>GGAGAUG</u> GUCUAACA AUGGAC	7 nt
<i>gvpF</i> *	AUCCCAAGGAAGAGAGACCA AUGACU	5 nt
<i>gvpG</i>	AACAAGGAGGCGGAUAAUGC AUGUUC	7 nt
<i>gvpH</i>	CGCAU <u>GGAGGU</u> CAAGAAUA AUGGUA	7 nt
<i>gvpI</i>	ACCGAU <u>GGAGGUG</u> AAUCCAC AUGAGC	6 nt
<i>gvpJ</i>	CACUGAGGAC <u>GAGGUGA</u> ACG AUGAGU	6 nt
<i>gvpK</i>	AGCGGAGGAGACCAAATGAG AUGGAA	6 nt
<i>gvpL</i>	GAAUCCAGCGUGAUGACGU AUGACU	6 nt
<i>gvpM</i>	GCGCCAGAU <u>AUUGGUA</u> AAUA AUGGAG	3 nt

Abb.4 Mögliche Shine-Dalgarno-Sequenzen stromaufwärts des Startcodons der einzelnen p-vac-Gene aus *Hb. salinarum* PHH1. Die SD-Sequenz oben ist für *Hb. salinarum* und *Hf. volcanii* identisch. Die Gene *gvpA*, *gvpD*, *gvpF* und *gvpO* sind die ersten Gene der jeweiligen Transkripte und mit einem * gekennzeichnet. Nukleotide, die Teil der möglichen SD-Sequenz sind, sind grau unterlegt. Nukleotide, die identisch mit der SD-Sequenz oben sind, wurden unterstrichen. Das AUG-Startcodon der jeweiligen Gene ist kursiv dargestellt.

1.1 Mutation der SD-Sequenz des p-*gvpH*-Gens mit GvpH als Reporter

Für die Herstellung der Konstrukte wurde der p-*gvpH*-Leserahmen und Sequenzen stromaufwärts des Startcodons mittels PCR amplifiziert und in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 inseriert (Pfeifer, et al., 1994). In dem Konstrukt p-*gvpH*/pJAS (H-Konstrukt) befindet sich der p-*gvpH*-Leserahmen unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors (Pfeifer et al., 1993). Die daraus resultierende *gvpH*-mRNA besitzt eine 43 nt lange neue *leader*-Region, bei der verschiedene Sequenzen fusioniert wurden. Die 11 nt am 5'-Bereich der mRNA stammen vom *fdx*-Gen, danach folgt ein Spacer von 13 nt, der ein UGA-Stopcodon enthält und schließlich 20 nt vom 5'-UTR des p-*gvpH*-Gens einschließlich der SD-Sequenz (Abbildung 5). Das eingefügte Stopcodon soll verhindern, dass die Translation bereits am noch vorhandenen Startcodon des *fdx*-Gens beginnt.

+1 →

H **GAUGCCCAUGG**ACAGAUgaUCGAUCGCAUGGAGGUCAAGAAUA**AUGGUACCCGACGCC**—*gvpH*

SD7H **GAUGCCCAUGG**.....CCUAAA.C.....—*gvpH*

Abb. 5 *leader*-Sequenz des H und SD7H-Konstrukts. Die 11 nt am 5'-Ende stammen vom *fdx*-Gen und sind fettgedruckt dargestellt. Die mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz ist unterstrichen, das UGA-Stopcodon, das in den *leader* eingefügt wurde ist in Kleinbuchstaben geschrieben. Das AUG-Startcodon und die ersten 15 nt des p-*gvpH*-Leserahmens sind kursiv und fettgedruckt dargestellt.

Das H-Konstrukt diente als Wildtyp, da es die unveränderte SD-Sequenz in ihrer natürlichen Umgebung enthält. Auf die gleiche Weise wurde ein weiteres Konstrukt SD7H hergestellt, bei dem die SD-Sequenz GGAGGUCA nach CCUAAACC mutiert wurde (Abbildung 5). Die Richtigkeit der Fusion und Sequenz beider Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzanalyse bestimmt. Beide Konstrukte wurden anschließend jeweils zur Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 eingesetzt. Die Plasmide der beiden Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Für die Analyse der Expression der Genregionen wurden zunächst Northern-Analysen mit der Gesamt-RNA durchgeführt, um sicherzustellen, dass in beiden Transformanten H und SD7H die mRNA in gleicher Menge vorhanden ist. Weiterhin wurden Western-Analysen mit dem GvpH-Antiserum (Hofacker & Pfeifer, unveröffentlicht) durchgeführt.

Expression des p-*gvpH*-Gens

Für die Northern-Analyse wurden zunächst Proben aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrollen wurden *Hf. volcanii* WFD11 (Hv) und eine *Hf. volcanii*-Transformante, die die p-vac-Region enthält verwendet. Durch Anfärben der Nylonmembran mit Methylenblau wurde die 16S und 23S rRNA sichtbar gemacht (Abbildung 6) und gezeigt, dass von allen Transformanten ähnliche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden.

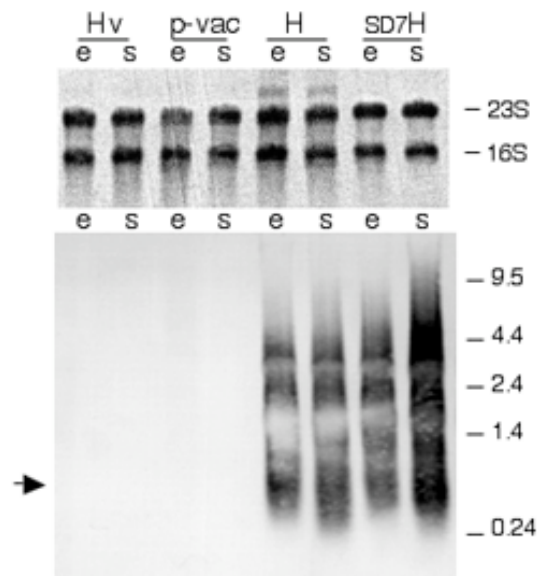


Abb. 6 Northern-Analyse zur Detektion der *p-gvpH*-mRNA. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA als Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA-Präparationen. Bei der Northern-Analyse darunter sind auf der rechten Seite die RNA-Größenstandards in kb angegeben. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen H-Sonde. Der Pfeil zeigt die Mindestgröße der erwarteten *gvpH*-mRNA.

Die H-Sonde hybridisierte weder mit der mRNA aus *Hf. volcanii*, was erwartet wurde, noch mit mRNA aus der *p-vac*-Transformante. Dass die *p-gvpH*-mRNA in der *p-vac*-Transformante nicht detektiert werden konnte, liegt an der schwachen Expression der Gene unter dem nativen Promotor, bzw. dem raschen Abbau der *gvpF-M*-mRNA.

In beiden Transformanten H und SD7H wurde die *p-gvpH*-mRNA mit der strangspezifischen H-Sonde in etwa der gleichen Menge detektiert (Abbildung 6). Man kann daher davon ausgehen, dass durch die Mutation der SD-Sequenz (SD7H-Transformante) die Transkriptionmenge des *gvpH*-Gens nicht beeinflusst wurde. Neben der erwarteten 600 nt *p-gvpH*-mRNA hybridisierte die Sonde mit mRNAs verschiedener Größe. Dies liegt daran, dass am 3'-Ende der *p-gvpH*-mRNA keine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden war und somit auch längere mRNAs gebildet wurden.

Für die anschließend durchgeführte Western-Analyse wurden Proben der verschiedenen Transformanten aus der stationären Wachstumsphase entnommen und die Proteine isoliert. Es wurden je 20 μ g Gesamt-Protein der einzelnen Proben über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. In der folgenden Western-Analyse zeigte das GvpH-Antiserum keine Reaktion mit Proteinen aus *Hf. volcanii* (Hv), was ebenfalls erwartet wurde (Abbildung 7). Es konnte allerdings auch kein GvpH-Protein in der *p-vac*-Transformante nachgewiesen werden, dies lag an der niedrigen Expression, was auch die Northern-Analyse bereits zeigte. In der SD7H-Transformante wurde etwas weniger GvpH-Protein detektiert, als in der Wildtyp-

Transformante (H-Mutante) (Abbildung 7). Eine genauere Quantifizierung war allerdings nicht möglich.

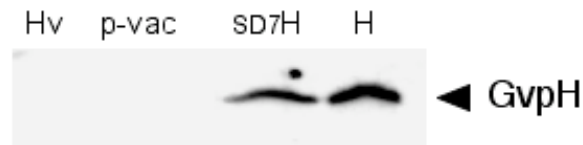


Abb. 7 Western-Analyse zum Nachweis des GvpH-Proteins. Es wurden jeweils 20 μ g Gesamtprotein aus der stationären Wachstumsphase über ein 16%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem GvpH-spezifischen Antiserum. Als Kontrolle wurde Gesamtprotein aus *Hf. volcanii* WFD11 (Hv) aufgetragen und von einer Transformante, die die p-vac-Region enthielt. Der Pfeil zeigt das detektierte GvpH-Protein.

Das Fehlen der SD-Sequenz führt nicht zu einem vollständigen Verlust der Translation diese ist aber reduziert, wenn das SD-Element nicht vorhanden ist.

1.2 *Scanning*-Mutagenese des 5'-UTR des p-*gvpH*-Gens mit dem *bgaH*-Reportergen

Um die Veränderungen in der Translationseffizienz besser quantifizieren zu können, wurde das *bgaH*-Gen, das für ein Enzym mit β -Galaktosidase-Aktivität kodiert, als Reportergen verwendet. Das *bgaH*-Gen stammt aus *Hf. lucentense* (Holmes *et al.*, 1997; Holmes & Dyall-Smith, 2000). Die Experimente mit dem *bgaH*-Reportergen sollten zum einen die Experimente aus den vorangegangenen Western-Analysen bestätigen, zum anderen sollte mit Hilfe einer *scanning*-Mutagenese im 5'-UTR überprüft werden, welche Sequenzen im 5'-UTR für die Initiation der Translation wichtig oder gar essentiell sind.

Die Mutagenese des 5'-UTRs wurde in Schritten von 4 nt durchgeführt (Abbildung 8). Da für die PCR degenerierte Primer verwendet wurden, konnte jede Base zufällig gegen eine der anderen drei Basen ausgetauscht werden, sodass man für jede zu mutierende Region eine Vielzahl verschiedener Mutanten erhielt (Abbildung 8).

SD-Sequenz	GGAGGUGA
H- <i>bgaH</i>	CGCAUGGAGGUCAAGAAUAAUG
SD0-1	.AAUC.....
SD0-3	.UACC.....
SD0-4	.UAUA.....
SD0-6	.CACC.....
SD1-2	...GAAA.....
SD1-5	...GCUU.....
SD1-6	...GGAC.....
SD1-7	...GAUA.....
SD2-1UUCC.....
SD2-4ACCA.....
SD3-2CCUA.....
SD3-3CACA.....
SD3-5CAUC.....
SD4-1ACAC.....
SD4-3AGAU.....
SD4-4CGUC.....
SD4-5AGGC.....
SD4-6UCUC.....
SD5-1UAUG.....
SD5-5CCAU.....
SD5-6CAUG.....
SD5-7CAGG.....
SD8G.....
SD7CCUAAA.C.....

Abb. 8 *Scanning*-Mutagenese des 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens. Es sind nur die 20 nt oberhalb des Startcodons gezeigt. Die SD-Sequenz ist unterstrichen, die Lage der SD-Sequenz in den Mutanten und dem Wildtyp ist mit einem grauen Kasten unterlegt. Identische Basen sind durch Punkte gekennzeichnet.

Die Fusion der Fragmente mit dem *bgaH*-Leserahmen erfolgte innerhalb des *p-gvpH*-Leserahmens (Abbildung 9), da eine Fusion direkt am Startcodon manchmal zu Konstrukten führt, die zwar transkribiert aber nicht translatiert werden können (Gregor & Pfeifer, 2001). Alle Fusionsproteine enthielten daher am N-Terminus zusätzlich die ersten 5 Aminosäuren MVPDA¹ des GvpH-Proteins.

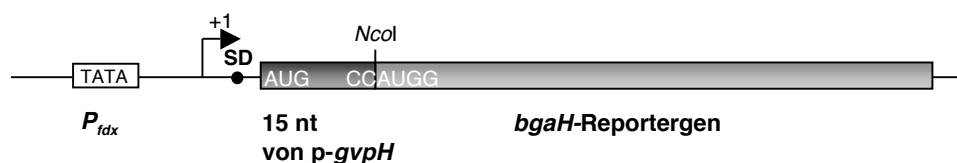


Abb. 9 Schematische Darstellung des H-*bgaH*-Konstrukts im Expressionsvektor pJAS35. +1 bezeichnet den Transkriptionsstart. Die TATA-Box des Promotors ist als Kasten mit TATA dargestellt. Die Lage der Shine-Dalgarno Sequenz ist mit SD und einem Punkt gekennzeichnet.

Die mittels PCR hergestellten Konstrukte wurden als *NcoI*-Fragmente in das bereits vorhandene Konstrukt *fdx-bgaH* inseriert (Gregor & Pfeifer, 2005). Das H-*bgaH*-Fusionskonstrukt wurde als Wildtyp (WT) verwendet, da es den 5'-UTR in unveränderter Form enthielt. Es enthielt den gleichen 5'-UTR wie das H-Konstrukt aus Kapitel 1.1,

¹ Aminosäuren MVPDA: M=Met, V=Val, P=Pro, D=Asp, A=Ala

Abbildung 5. Das SD7-Konstrukt entspricht dem SD7H-Konstrukt. Die Richtigkeit der Fusion und Sequenz der Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzanalyse bestimmt. Die Konstrukte wurden anschließend zur Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 eingesetzt. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Für Northern-Analysen, zur Bestimmung der *bgaH*-Transkriptmenge, wurde Gesamt-RNA aus den Transformanten isoliert. Daneben wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in den Transformanten mit Hilfe des ONPG-Enzymtests quantifiziert.

Für die Analyse wurden die verschiedenen *Hf. volcanii*-Transformanten in 3 M NaCl-Medium bei 37°C für ca. 71,5 h und 180 upm schüttelnd inkubiert. Es wurden jeweils zwei bis drei Transformanten mit dem gleichen Konstrukt verwendet, um die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität mittels des ONPG-Tests zu bestimmen.

Analyse der verschiedenen SD-Transformanten

Zunächst wurden für die Northern-Analyse die Gesamt-RNA aus Zellen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert. Durch Anfärben der Nylonmembran mit Methylenblau wurde die 16S und 23S RNA sichtbar gemacht, um Qualität und Quantität der Gesamt-RNA Präparationen zu vergleichen (Abbildung 10). Mit einer gegen die *bgaH*-mRNA gerichtete Sonde wurde die 2,2 kb lange mRNA detektiert (Abbildung 10). Zunächst schien es, als wäre von den Transformanten SD5-1 und SD8 weniger *bgaH*-mRNA vorhanden, die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte aber, dass von diesen beiden Transformanten weniger Gesamt-RNA im Vergleich zu den übrigen Proben aufgetragen wurde. Bezieht man dies mit ein, kann man sagen, dass bei allen Transformanten die gewünschte *bgaH*-mRNA in ähnlicher Menge vorhanden war. Repräsentativ ist hier nur eine Northern-Analyse gezeigt, da die Northern-Analysen der Gesamt-RNA von allen anderen SD-Transformanten ein ähnliches Ergebnis erbrachten. Alle SD-Transformanten bildeten das *bgaH*-Transkript in annähernd gleicher Menge. Man kann daher annehmen, dass die eingeführten Mutation im 5'-UTR die Menge der Transkripte nicht beeinflusst und mögliche Unterschiede in den BgaH-Aktivitäten Veränderungen in der Translation widerspiegeln. Die von der *bgaH*-Sonde detektierten längeren mRNAs, resultieren wiederum von der fehlenden Transkriptions-Terminationssequenz am 3'-Ende des *bgaH*-Gens. Die kürzeren mRNAs zeigten den raschen Abbau des Transkripts.

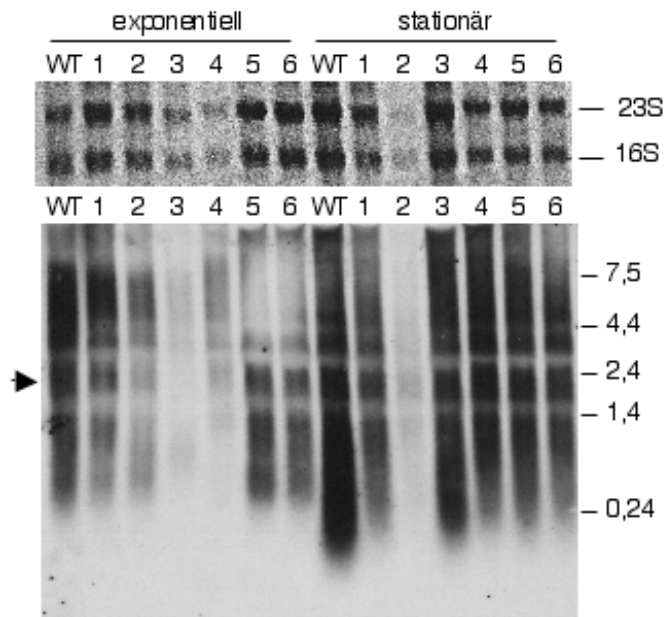


Abb. 10 Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde als Kontrolle der Qualität und Quantität der RNA-Präparationen benutzt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Auf der rechten Seite sind die RNA-Größenstandards in kb angegeben. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Der Pfeil zeigt die Mindestgröße der erwarteten *bgaH*-mRNA. WT bezeichnet den Wildtyp, 1=SD0-1, 2=SD1-5, 3=SD5-1, 4=SD7(A), 5=SD7(B) und 6=SD8

Anschließend wurde zunächst der Wachstumsverlauf und die spezifische Aktivität für die WT-Transformante, die den unveränderten 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens enthielt, untersucht. Abbildung 11 zeigt den typischen Wachstumsverlauf einer *Hf. volcanii*-Transformante, die das *bgaH*-Fusionskonstrukt, unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors, exprimierte. Parallel zur optischen Dichte wurde auch die spezifische Aktivität der BgaH bestimmt. Es zeigte sich, dass unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors zunächst in der exponentiellen Wachstumsphase die spezifische Aktivität parallel zum Wachstum anstieg (Abbildung 11). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase nahm die spezifische Aktivität wieder ab und blieb dann während der stationären Wachstumsphase konstant. Es wurden jeweils die Werte der spezifischen Aktivität aus der stationären Wachstumsphase gemittelt. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten zeigten, dass der *fdx*-Promotor vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase aktiv ist. Für die WT-Transformante wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität (stationär) von 180 ± 31 mU/mg gemessen, diese wurde auf 100% festgesetzt.

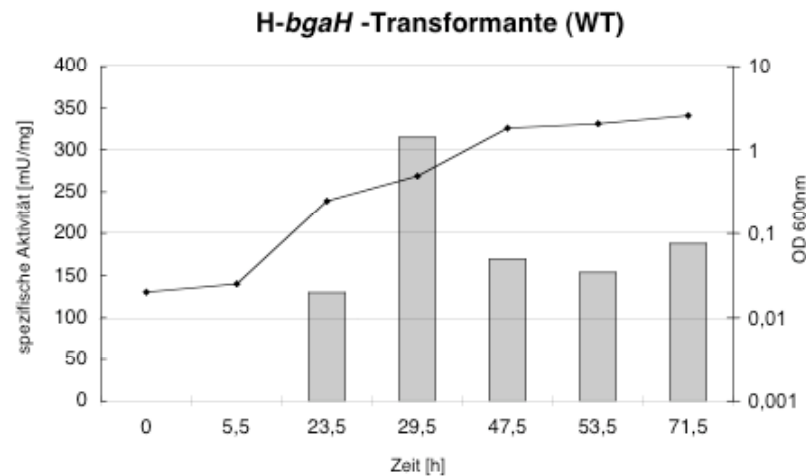


Abb. 11 Wachstums- und spezifische Aktivitätskurve der H-*bgaH*-Transformante (WT). Die optische Dichte (OD_{600nm}) und die spezifische Aktivität [mU/mg] sind gegenüber der Zeit aufgetragen.

Für die vier SDD0-Transformanten (Abbildung 12), die Mutationen direkt stromaufwärts der SD-Sequenz enthalten, wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität zwischen 90–120% verglichen mit dem WT gemessen. Dies zeigte, dass die Sequenz direkt stromaufwärts der SD-Sequenz anscheinend für die Translation keine Bedeutung hat. Die vier SD1-Transformanten tragen 2 nt stromaufwärts der SD-Sequenz und 2 nt innerhalb der SD-Sequenz Mutationen (Abbildung 12). Die durchschnittlich gemessenen spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 5 bis 20%. Die Translation bei diesen Transformanten war deutlich reduziert, demnach ist bei diesen Transformanten der mutierte Sequenzbereich wichtig für eine gute Translation. Ähnliche Ergebnisse erhielt man für die spezifische Aktivität der beiden SD2-Transformanten und der drei SD3-Transformanten, die alle Mutationen innerhalb der vermuteten SD-Sequenz haben (Abbildung 12).

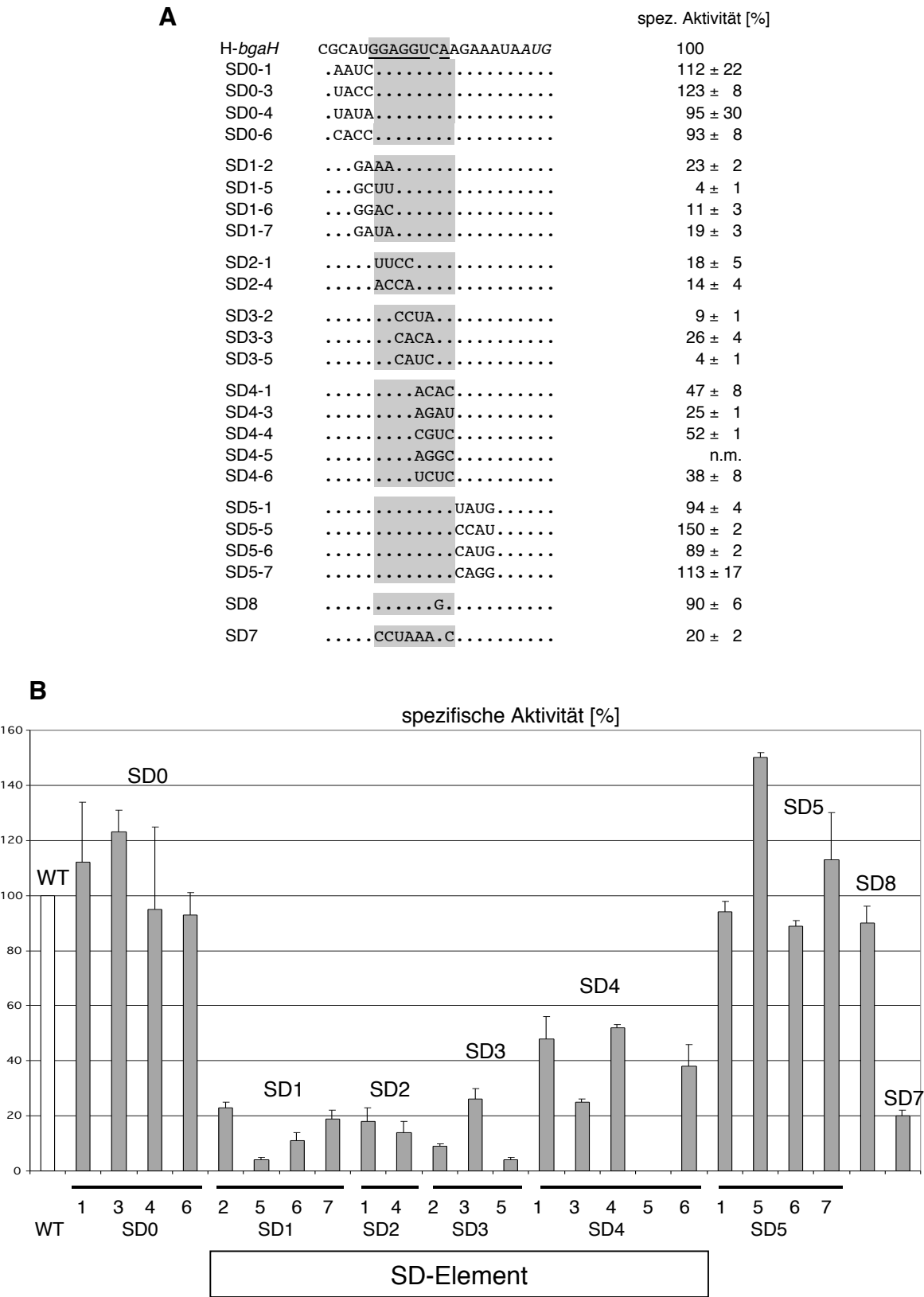


Abb. 12 (A) *Scanning*-Mutagenese des 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens. Die SD-Sequenz ist unterstrichen dargestellt, die Lage der SD-Sequenz ist mit einem grauen Kasten unterlegt. Identische Basen sind durch Punkte gekennzeichnet. Die spezifischen Aktivitäten sind in [%] angegeben, n.m. bedeutet keine messbare β -Galaktosidase-Aktivität. **(B)** Balkendiagramm der spezifischen Aktivität für die *H-bgaH*-Transformante (WT) und die verschiedenen SD0 bis SD8-Mutanten. Die spezifische Aktivität ist in [%] angegeben. Die spezifische Aktivität der WT-Transformante wurde auf 100% festgelegt und entspricht 180 ± 31 mU/mg.

Die spezifischen Aktivitäten für die SD2- und SD3-Transformanten lagen zwischen 4-26%. Für vier der fünf SD4-Transformanten, die Mutationen im 3'-Bereich der SD-Sequenz haben, lagen die durchschnittlichen spezifischen Aktivitäten mit 25-50% dagegen etwas höher. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der 3'-Bereich der SD-Sequenz für die Initiation der Translation weniger wichtig ist, als der 5'-Bereich und somit die Sequenz GGAGG die Kernsequenz des SD-Elements darstellt. Für die SD4-5-Transformante konnte dagegen keine spezifische BgaH-Aktivität gemessen werden (Abbildung 12). Eine mögliche Erklärung für den Ausfall der Translation in dieser Mutante ist, dass durch die veränderte Sequenz ein weiteres SD-Element erzeugt wurde (Abbildung 13), das allerdings zu nah am Startcodon liegt.

+1
→

H- <i>bgaH</i>	GAUGCCCAUGG ACAGAUCAUGCAUGGAGGUC <u>AA</u> GAAAUA AUGGUACCCGACGCC <i>Caug-bgaH</i>
SD4-5	GAUGCCCAUGG ACAGAUCAUGCAUGGAGG <u>GCAGAAAUA</u> AUGGUACCCGACGCC <i>Caug-bgaH</i>

Abb.13 mRNA-*leader*-Sequenzen der H-*bgaH* und des SD4-5-Konstrukts. Die ersten 11 nt aus dem mRNA-*leader*-Bereich stammen vom *fdx*-Gen (fettgedruckt), an die die genaufwärts des p-*gvpH* lokalisierte Sequenz fusioniert ist, das mögliche SD-Element von H-*bgaH* und das mögliche neue SD-Element der SD4-5-Mutante ist unterstrichen dargestellt. Die ersten 15 nt des p-*gvpH*-Leserahmens sind fett und kursiv gedruckt, das AUG-Startcodon des Reportergens in Kleinbuchstaben.

Für die vier SD5-Transformanten, die Mutationen direkt stromabwärts der SD-Sequenz enthalten, lagen die spezifischen Aktivitäten zwischen 85-150%, also annähernd in der gleichen Größenordnung wie für den WT. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass auch die Sequenzregion stromabwärts, ebenso wie die Sequenzregion stromaufwärts der SD-Sequenz, keine Bedeutung für die Translation hat.

Eine vollständige Mutation der SD-Sequenz von GGAGGUCA nach CCUAAACC wurde in der SD7-Transformante (Abbildung 12) erzeugt. Die Transformante zeigte immer noch eine BgaH-Aktivität, die etwa 20% der WT-Aktivität betrug (Abbildung 12). Dies zeigte, dass die SD-Sequenz nicht essentiell für die Initiation der Translation ist, da eine mRNA mit *leader*-Region, die keine Komplementarität zum 3'-Bereich der 16S rRNA enthält, immer noch translatiert werden kann. Eine vollständige Übereinstimmung mit der SD-Sequenz wie in der SD8-Transformante (Abbildung 12) führte zu keiner höheren BgaH-Aktivität im Vergleich zum WT (Abbildung 12).

Fast man alle Ergebnisse zusammen, so konnte mit Hilfe der *scanning*-Mutagenese im 5'-UTR von p-*gvpH* das SD-Element auf die 8 nt lange Sequenz GGAGGUCA, die 7 nt stromaufwärts des Startcodons liegt, festgelegt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die SD-Sequenz wichtig für eine effiziente Translation ist, wobei der 5'-Bereich (GGAGG) anscheinend bedeutender ist als der 3'-Bereich. Die SD-Sequenz ist aber nicht

absolut notwendig, da auch mRNAs mit *leader*-Bereichen translatiert wurden, die keine SD-Sequenz enthielten.

1.3 Deletion des 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens

Um die Bedeutung eines mRNA-*leaders* als solchen zu untersuchen, wurde der 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens vollständig deletiert und die BgaH-Aktivität bestimmt. Dazu wurden zwei verschiedene Konstrukte hergestellt und mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert. Das Δ lead-Konstrukt (Abbildung 14) enthält keinen 5'-UTR und die mRNA startet mit dem AUG-Startcodons des *bgaH*-Leserahmens. Das zweite Konstrukt Δ SD enthält zusätzlich noch die ersten 5 Codons des *p-gvpH*-Leserahmens (Abbildung 14), welche über eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert wurden. Die über PCR hergestellten Fragmente wurden über die *PstI*-Restriktionsschnittstelle in den Expressionsvektor pJAS35 inseriert. Die Richtigkeit der Sequenz und Fusion wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft. Anschließend wurden die Konstrukte zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet.

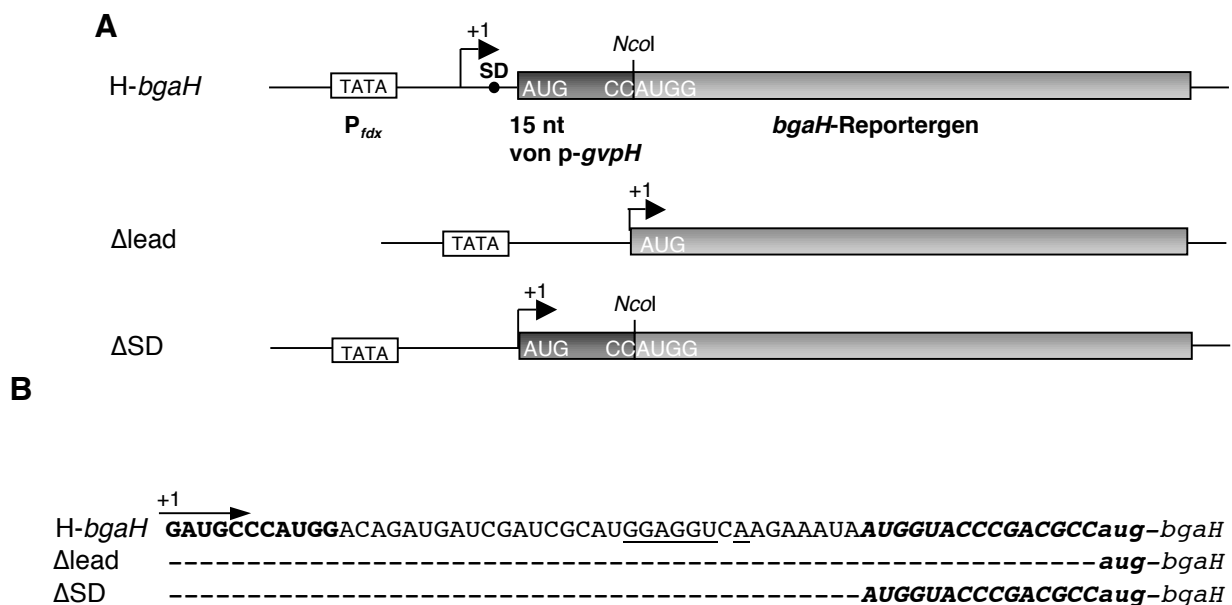


Abb. 14 (A) Schematische Darstellung des H-*bgaH*-Konstrukts im Expressionsvektor pJAS35 und der Mutanten Δ lead und Δ SD. Die TATA-Box des Promotors ist als Kasten mit TATA dargestellt. Die Lage der Shine-Dalgarno Sequenz ist mit SD und einem Punkt gekennzeichnet. **(B)** 5'-Bereich der mRNA-Sequenz der Konstrukte. +1 bezeichnet den Transkriptionsstart.

Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Zunächst wurden Northern-Analysen durchgeführt, um zu prüfen, ob die Transformanten die gleiche Menge des *bgaH*-Transkripts

bildeten. Anschließend wurde die BgaH-Aktivität bestimmt, um den Einfluss der verschiedenen mRNA-*leader* auf die Translation zu untersuchen.

Analysen der Δ lead- und Δ SD-Transformanten

Für die Northern-Analyse wurde aus den jeweiligen Transformanten die Gesamt-RNA aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte, die Qualität und Quantität der einzelnen RNA-Präparationen. Von allen Transformanten wurden annähernd gleiche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen (Abbildung 15). Zur Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Mit der Gesamt-RNA von *Hf. volcanii* hybridisierte die *bgaH*-Sonde nicht. In der H-*bgaH* (WT), Δ lead und Δ SD-Transformante wurde neben der 2,2 kb langen *bgaH*-mRNA auch noch längere und kürzere RNAs detektiert. Längere mRNAs entstanden dadurch, dass am 3'-Ende des *bgaH*-Gens keine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden war, die kürzeren RNAs zeigten den raschen Abbau dieser mRNA.

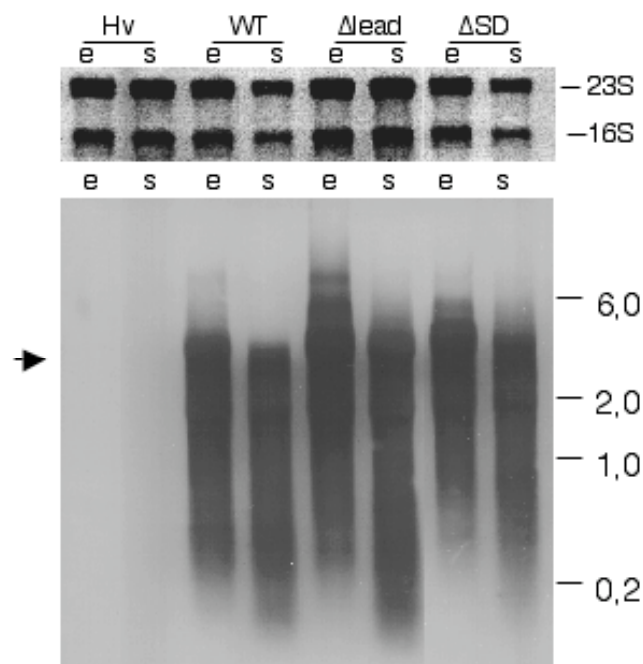


Abb. 15 Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in *Hf. volcanii* und den Transformanten, die das H-*bgaH*, Δ lead- und Δ SD-Konstrukt trugen. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA erstellt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Der Pfeil zeigt die Mindestgröße der erwarteten mRNA. Auf der rechten Seite sind die RNA-Größenstandards gezeigt in kb. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Bei allen Transformanten wurden jedoch die *bgaH*-mRNA in der gleichen Menge detektiert. Man kann daher annehmen, dass die Δ lead- und Δ SD-Transformante die gleichen Transkriptmengen bildeten wie der Wildtyp.

Anschließend wurde die spezifische Aktivität der jeweiligen Transformanten bestimmt. Die durchschnittlich gemittelte spezifische Aktivität für die WT-Transformante betrug etwa

180±31 mU/mg und wurde auf 100% festgesetzt. Die spezifischen Aktivitäten der Δ lead- und Δ SD-Transformante wurden in Relation zum WT in %-Werte umgerechnet (Abbildung 16).

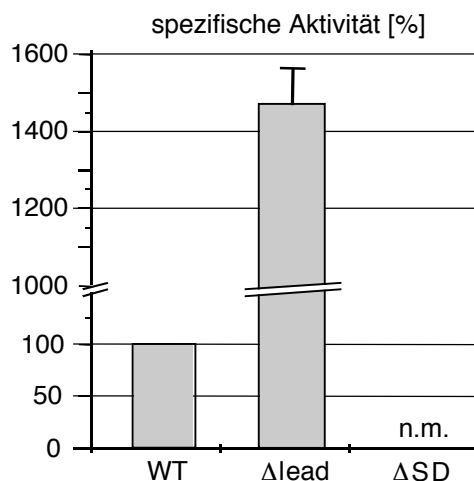


Abb. 16 Vergleich der spezifische Aktivität der *Hf. volcanii*-Transformanten mit dem Konstrukt H-*bgaH*, Δ lead und Δ SD in [%]. n.m. bedeutet, dass keine β -Galaktosidase-Aktivität messbar war.

Für die Δ lead-Transformante wurde eine 15fach erhöhte spezifische BgaH-Aktivität gemessen (Abbildung 16). Für die Δ SD-Transformante konnte überraschenderweise keine β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Die Δ SD-Transformante enthält zusätzlich die ersten 5 AS des p-*gvpH*-Leserahmens, wie auch alle vorher beschriebenen SD-Konstrukte der *scanning*-Mutagenese. Die BgaH-Aktivität sollte durch die 5 AS am N-Terminus nicht beeinflusst werden. Strukturvorhersagen mit dem RNA-Faltungsprogramm „Mfold“ zeigten eine mögliche stem-loop Struktur am 5'-Ende der mRNA (Abbildung 17), an der auch das AUG-Startcodon beteiligt ist. Dies führte möglicherweise dazu, dass die Translation nicht initiiert werden konnte.

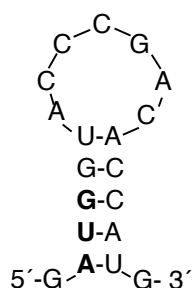


Abb.17 Mögliche mRNA-Sekundärstruktur der Δ SD-mRNA. Es sind die ersten 19 nt der mRNA gezeigt, das Startcodon ist fettgedruckt dargestellt.

1.4 Bestimmung des optimalen Abstandes zwischen der SD-Sequenz und dem Startcodon

Die SD-Sequenz dient als Erkennungssequenz der mRNA für die kleine ribosomale Untereinheit, gleichzeitig wird dadurch das AUG-Startcodon in die Nähe der Initiator-tRNA gebracht, die in der P-Bindestelle des Ribosoms gebunden ist (Bell & Jackson, 1998; Kozak, 1999). Ein definierter Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon ist daher notwendig. Bei Prokaryonten beträgt der Abstand mindestens 5 nt und maximal 13 nt, für *E. coli* liegt der optimale Abstand zwischen 8-10 nt (Chen *et al.*, 1994). In den bereits vollständig sequenzierten Archaeengenomen findet man häufig SD-Sequenzen in einem Abstand von 9-11 nt stromaufwärts des Startcodons (Ma *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde deshalb der Abstand des SD-Elements und dem AUG-Startcodon variiert, um die Auswirkung auf die Translation zu studieren. Ursprünglich liegt die SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens 7 nt stromaufwärts vom Startcodon (Abbildung 18). Durch Insertions- und Deletionsmutationen wurde der Abstand zwischen der SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens und dem Startcodon verlängert bzw. verkürzt. Mittels des *bgaH*-Reportergens wurde dann geprüft, ob die mRNA *in vivo* noch translatiert wird. Die Konstrukte (Abbildung 18) wurden über PCR hergestellt und über eine *NcoI*-Restriktionsschnittstelle mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und zwar am 5. Codon des *p-gvpH*-Leserahmens, wie schon im vorigen Versuchen beschrieben.

	+1 →	
H- <i>bgaH</i>	GAUGCCCAUGG ACAGAUCAUGCAUGCGAUGGAGGUCAAGAAUA AUGGUACCCGACGCC <i>aug-bgaH</i>	
H1	GAUGCCCAUGG AUG <i>aug-bgaH</i>	
H4	GAUGCCCAUGG AUG <i>aug-bgaH</i>	
H5	GAUGCCCAUGG AUG <i>aug-bgaH</i>	
H10	GAUGCCCAUGG ACAGAUgAUcgAUCGAUGGAGGUCAAGuauAAUA AUG <i>aug-bgaH</i>	

Abb. 18 mRNA-leader-Sequenzen von H-*bgaH* und den verschiedenen SD-Abstandsmutanten. Die ersten 11 nt aus dem mRNA-leader-Bereich stammen vom *fdx*-Gen (fettgedruckt), an die eine genaufwärts des *p-gvpH*-Gens lokalisierte Sequenz fusioniert ist. Das mögliche SD-Element von H-*bgaH* ist unterstrichen, Nukleotide die identische zur WT-Sequenz in H-*bgaH* sind wurden durch Punkte gekennzeichnet. Deletierte Nukleotide sind durch Striche markiert, inserierte Nukleotide in Kleinbuchstaben angegeben. Die ersten 15 nt des *p-gvpH*-Leserahmens sind fett und kursiv gedruckt, das AUG-Startcodon des *bgaH*-Reportergens in Kleinbuchstaben. +1 markiert den Transkriptionsstart.

Die Richtigkeit der Sequenz und Fusion wurde mittels DNA-Sequenzanalyse geprüft. Anschließend wurden die Konstrukte zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und durch Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Mittels Northern-Analyse wurde die Transkriptmenge der *bgaH*-mRNA in den Transformanten überprüft. Anschließend wurde die

BgaH-Aktivität der einzelnen Transformanten bestimmt, um den Einfluss der Veränderungen des Abstands zwischen SD-Sequenz und Startcodon auf die Translation zu untersuchen.

Analyse der verschiedenen SD-Abstandsmutanten

Zunächst wurde die Gesamt-RNA der entsprechenden Transformanten aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert. Zur Kontrolle wurde die Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* (Hv) isoliert. Nach der Auftrennung der RNA über ein formaldehydhaltiges Agarosegel und anschließendem Transfer auf eine Nylonmembran, wurde diese mit Methylblau-gefärbt, um die 23S und 16S rRNA sichtbar zu machen (Abbildung 19). Bei allen Transformanten wurden ähnliche RNA-Mengen gleicher Qualität aufgetragen. Allerdings wurde von der Probe der H-*bgaH*-Transformante (H) aus der exponentiellen Wachstumsphase mehr Gesamt-RNA aufgetragen im Vergleich zu den restlichen Proben.

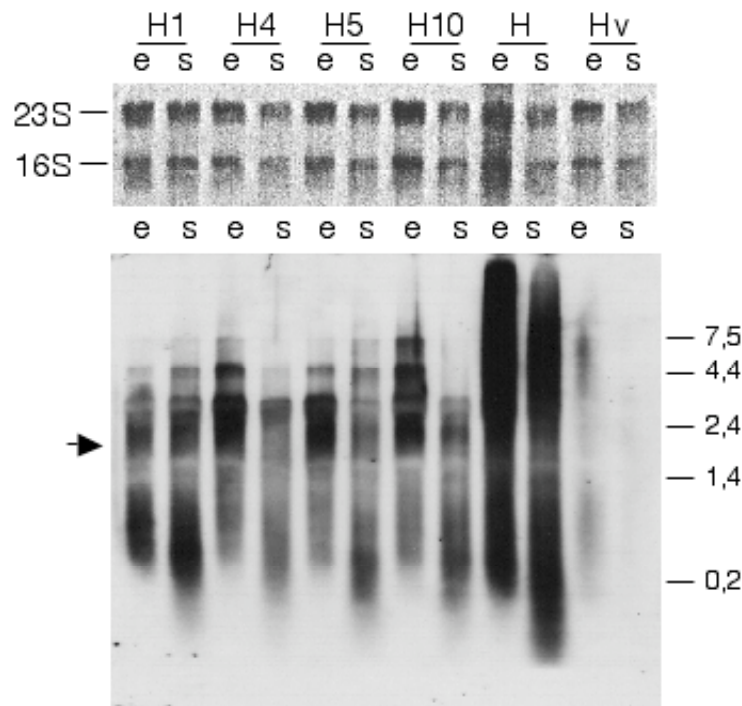


Abb. 19 Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in der H-*bgaH*-Transformante und den verschiedenen SD-Abstandsmutanten (H1, H4, H5 und H10). Es wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA erstellt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Auf der rechten Seite sind die RNA-Größenstandardst in kb angegeben. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Der Pfeil zeigt die Mindestgröße der erwarteten *bgaH*-mRNA.

Zur Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Die *bgaH*-Sonde hybridisierte erwartungsgemäß nicht mit RNA aus *Hf. volcanii*. Bei den verschiedenen Transformanten wurde die 2,2 kb lange *bgaH*-mRNA in ähnlicher Menge gebildet (Abbildung 19). Es wurden auch längere und kürzere RNAs detektiert. Die längeren

RNAs entstanden dadurch, dass am 3'-Ende der mRNA keine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden ist, die kürzeren mRNAs zeigten den raschen Abbau des Transkripts. Die leichten Schwankungen der Transkriptmenge (vor allem die großen Mengen bei der H-*bgaH*-Transformante), sind auf die unterschiedlich aufgetragenen RNA-Mengen zurückzuführen. Man kann annehmen, dass die Insertionen bzw. Deletionen im mRNA-*leader*-Bereich keinen Einfluss auf die Transkriptmengen in den Abstandsvarianten haben.

Anschließend wurden die spezifischen Aktivitäten der jeweiligen Transformanten bestimmt. Die spezifische Aktivität für die WT-Transformante betrug etwa 180 ± 31 mU/mg und wurde auf 100% festgelegt. Die spezifische Aktivität der jeweiligen Abstandsmutanten wurde in Relation zum WT in %-Werte umgerechnet. Für die H4-Transformante (4 nt zwischen SD-Sequenz und Startcodon) und die H10-Transformante (Abstand auf 10 nt zwischen SD-Sequenz und Startcodon erhöht) lag die durchschnittliche spezifische Aktivität annähernd bei 100% (Abbildung 20). Ein Abstand von 4 bzw. 10 nt scheint ausreichend zu sein, damit das AUG-Startcodon mit der Initiator-tRNA wechselwirken kann. Bei der H1-Transformante, bei der der Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon lediglich 1 nt betrug, konnte dagegen keine β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Ein Abstand von nur 1 nt zwischen SD-Element und AUG-Startcodon war demnach zu gering, um noch zu einer Translation zu führen.

Für die H5-Transformante mit einem Abstand von 5 nt zwischen SD-Sequenz und Startcodon wurde eine gemittelte spezifische BgaH-Aktivität von nur 10% verglichen mit dem WT gemessen. Dies war überraschend, da ein Abstand von 5 nt zur Initiation der Translation ausreichen sollte.

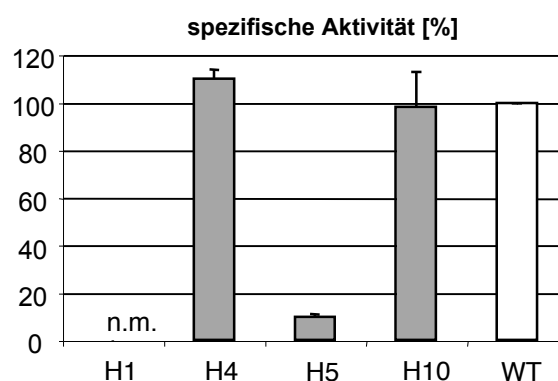


Abb. 20 Balkendiagramm der spezifischen Aktivität für die H-*bgaH*-Transformante (WT) und die verschiedenen SD-Abstandsmutanten. Die spezifische Aktivität ist in [%] angegeben. Die spezifische Aktivität der WT-Transformante wurde auf 100% festgelegt und entspricht etwa 180 ± 31 mU/mg.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz zwischen 4-10 nt liegen kann.

2. Untersuchungen zur Funktion des p-*gvpA*-mRNA-*leaders*

Häufig findet man vor archaealen Genen im 5'-UTR keine SD-Sequenz und zwar meist vor Genen, die monocistronisch transkribiert werden oder am Anfang eines Operons stehen (Tolstrup *et al.*, 2000). Ein Beispiel hierfür ist das p-*gvpA*-Gen aus *Hb. salinarum*. Es besitzt einen 20 nt langen mRNA-*leader* und wird sowohl monocistronisch transkribiert, als auch als Teil des p-*gvpACNO*-Transkripts (Englert *et al.*, 1992; Offner *et al.*, 1996). Im *gvpA*-mRNA-*leader* befindet sich keine Sequenz, die einer möglichen SD-Sequenz entspricht (Abbildung 21). Das p-*gvpA*-Transkript, das für das Hauptstrukturprotein der Gasvesikel codiert (Horne & Pfeifer, 1989), wird dennoch sehr effizient translatiert. Am 5'-Ende des mRNA-*leaders* befindet sich eine kleine Sekundärstruktur (5'-GGGUUAAUCC-3'), die möglicherweise an der extrem hohen Stabilität dieser mRNA beteiligt ist. Ob Sequenzen des mRNA-*leaders* für die Initiation der Translation wichtig sind, wurde durch Mutagenese des mRNA-*leaders* überprüft.

2.1 Mutagenese des p-*gvpA*-mRNA-*leaders*

Dazu wurde der 20 nt lange mRNA-*leader* schrittweise durch Basensubstitution von je 5 nt durchmutiert (Abbildung 21). Durch die Verwendung von degenerierten Primern erhielt man für jede mutierte Region unterschiedliche Mutanten. Die Fusion mit dem *bgaH*-Leserahmen erfolgte nach dem sechsten Codon des *gvpA*-Leserahmens. Die Konstrukte wurden mittels PCR amplifiziert und in den pBluescript II Sk(+) Vektor, der bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt, inseriert. Anschließend wurden die Fragmente als komplettes Fusionskonstrukt in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde die Sequenz bestimmt und die Richtigkeit der Fusion überprüft. Die Konstrukte wurden anschließend zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Für Northern-Analysen, zur Bestimmung der Transkriptmenge, wurde Gesamt-RNA aus den Transformanten isoliert. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität mittels des ONPG-Tests, wurden die Transformanten 48 h bei einer OD_{600nm} von 1,8 bis 2,1 in 3 M NaCl-Medium bei 37°C und 180 upm inkubiert.

<i>A-bgaH</i>	$\xrightarrow{+1}$ <u>GGGUUAA</u> <u>UCC</u> CAGAUCCACCA <u>AUGGCGCA</u> ACCAGAUUCCaug
pA-mTL-A1	.AUA <u>AU</u> AUGaug
pA-mTL-A2	.AAGGG..... AUGaug
pA-mTL-A3	.CCCAC..... AUGaug
pA-mTL-B1ACCGA..... AUGaug
pA-mTL-B2C.CAU..... AUGaug
pA-mTL-B3AUUAG..... AUGaug
pA-mTL-B4 <u>AUG</u> AG..... AUGaug
pA-mTL-C1CGGGCA..... AUGaug
pA-mTL-C2AGGGCA..... AUGaug
pA-mTL-C3CGAACA..... AUGaug
pA-mTL-C4AAAGCA..... AUGaug
pA-mTL-D1UCAAG... AUGaug
pA-mTL-D2ACAGG... AUGaug
pA-mTL-D3UCAUC... AUGaug
pA-mTL-D4UGAAC... AUGaug
pA-mTL-E1UCAGCA AUGaug
pA-mTL-E2AUAGCA AUGaug
pA-mTL-E3 <u>--GCG</u> AUGaug
pA-mTL-E4ACAGCA AUGaug

Abb. 21 Mutagenese des p-*gvpA*-mRNA-*leaders*. Die Wildtyp-Sequenz ist oben angegeben. +1 markiert den Transkriptionsstart. Die an der stem-loop-Struktur beteiligten Nukleotide sind unterstrichen. Die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens sind fett und kursiv gedruckt, das AUG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens in Kleinbuchstaben. Die Sequenzen der verschiedenen mTL-Mutanten sind darunter angegeben. Identische Nukleotide mit dem WT sind durch Punkte dargestellt. Durch die Mutation zufällig erzeugte Startcodons sind unterstrichen. Deletierte Nukleotide sind durch Striche dargestellt.

Die spezifische Aktivität wurde nur für die Transformanten bestimmt, die zusätzlich den Transkriptionsaktivator GvpE enthielten, da die basale P_A -Promotoraktivität sehr niedrig ist und die Nachweisgrenze der β -Galaktosidase bei 0,5 bis 1 mU/mg liegt. Die *A-bgaH*-Transformante, die den unveränderten p-*gvpA*-mRNA-*leader* enthält, wurde als Wildtyp (WT) verwendet. Es wurden jeweils zwei verschiedene Transformanten mit dem gleichen Konstrukt verwendet, um die spezifische β -Galktosidase-Aktivität mittels des ONPG-Tests zu messen.

Analyse der verschiedenen mTL-Transformanten

Zunächst wurde für die Northern-Analyse die Gesamt-RNA der verschiedenen Transformanten (mTL-A1, -B1, -C3, -D1, -E1) aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert, sowie von der *A-bgaH*-Transformante und *Hf. volcanii* (Hv) als Kontrolle. Zur Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte, dass von allen Transformanten ungefähr die gleiche Menge an Gesamt-RNA in gleicher Qualität aufgetragen wurde (Abbildung 22). Mit Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* hybridisierte die *bgaH*-Sonde nicht. Die A-

bgaH-Transformante bildete im Vergleich zu den restlichen Mutanten sowohl in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase etwas mehr *bgaH*-Transkript. Es wurden auch längere und kürzere RNAs detektiert. Durch das Fehlen einer Transkriptions-Terminationssequenz am 3'-Ende wurden auch längere RNAs gebildet, die kürzeren RNAs zeigten den raschen Abbau des Transkripts. Bei allen Transformanten konnte die *bgaH*-mRNA in annähernd gleicher Menge detektiert werden, wobei in der stationären Wachstumsphase etwas mehr gebildet wurde als in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 22). Es ist daher davon auszugehen, dass die eingeführten Mutationen keinen Einfluss auf die Transkriptmenge haben.

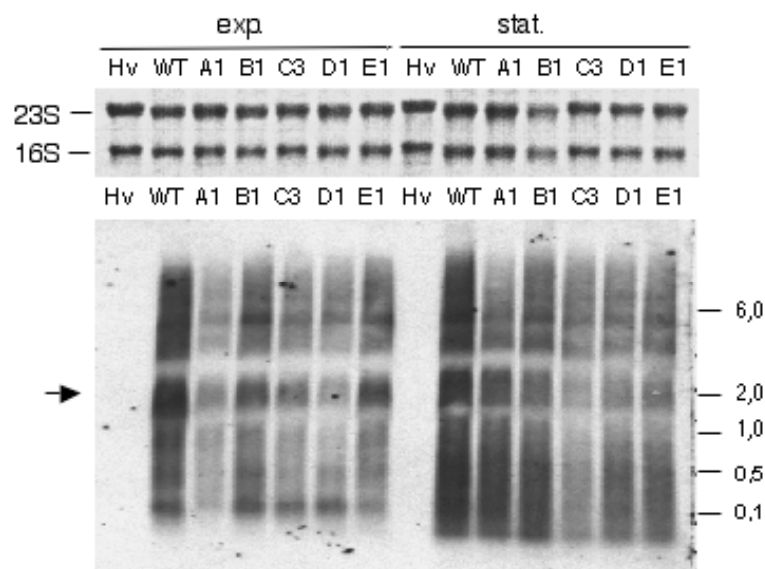


Abb. 22 Northern-Analyse zum Nachweis der *bgaH*-mRNA in den Transformanten, die das *bgaH*-Fusionskonstrukt A-*bgaH*, mTL-A1, -B1, -C3, -D1 und -E1 trugen. Es wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA aus der exponentiellen (exp.) und stationären (stat.) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde als Kontrolle der Qualität und Quantität benutzt. Die Northern-Analyse ist unten gezeigt. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Die RNA-Größenstandards sind rechts in kb angegeben. Der Pfeil zeigt die Mindestgröße der erwarteten *bgaH*-mRNA.

Anschließend wurde die spezifische Aktivität der einzelnen Transformanten bestimmt (Abbildung 23). Für die WT-Transformante (A-*bgaH*-Konstrukt) wurde eine spezifische Aktivität von 63 ± 15 mU/mg bestimmt (Abbildung 23). Die spezifischen Aktivitäten der meisten Transformanten lagen in derselben Größenordnung, wie die spezifische Aktivität des WT (Abbildung 23). Bei zwei der mTL-A-Transformanten, die Mutationen in der +2- bis +6-Region des *gvpA*-mRNA-*leaders* hatten, war die β -Galaktosidase-Aktivität leicht reduziert und lag zwischen 20 und 23 mU/mg. Die spezifische Aktivität der mTL-B2-Transformante war mit 144 mU/mg um das 2,5fache erhöht, die der mTL-B3-Transformante mit Mutationen

im gleichen Bereich dagegen leicht reduziert und lag bei 18 mU/mg. Durch die eingeführten Mutationen wurde bei der mTL-B4-Transformante ein zusätzliches AUG-Startcodon erzeugt, das außerhalb des offenen Leserahmens des eigentlichen Startcodons lag, die gemittelte spezifische Aktivität lag bei 8 mU/mg. Bei der Transformante mTL-C4, die Mutationen im +8 bis +13 mRNA-*leader*-Bereich besaß, war die BgaH-Aktivität reduziert. Bei drei der mTL-D-Transformanten, mit Mutationen im +13 bis +17 mRNA-*leader*-Bereich waren die spezifischen Aktivitäten ebenfalls leicht reduziert und lagen zwischen 47 und 25 mU/mg. Die mTL-D4-Transformante besaß dagegen eine 3fach höhere BgaH-Aktivität, als die Ausgangsaktivität des Wildtyps. Bei der Transformante mTL-E4, die Mutationen im +16- bis +20-Bereich besitzt, wurde durch die eingeführten Mutationen ein zusätzliches AUG-Startcodon erzeugt, das außerhalb des offenen Leserahmens zum ursprünglichen Leserahmen lag. Zusätzlich kam es zu einer Deletion von 2 nt, sodass der mRNA-*leader* auf 18 nt verkürzt wurde. Die gemittelte spezifische Aktivität der β -Galaktosidase lag bei 4 mU/mg.

A		+1 →	spez. Aktivität [mU/mg]
	<i>A-bgaH</i>	<u>UGGGUUA</u> <u>AUCC</u> CAGAUCCACCA <u>AUGGCGCA</u> ACCAGAUUCCaug	63 ± 15
	pA-mTL-A1	..AUAUU..... <u>AUG</u>aug	52 ± 11
	pA-mTL-A2	..AAGGG..... <u>AUG</u>aug	20 ± 7
	pA-mTL-A3	..CCCAC..... <u>AUG</u>aug	23 ± 2
	pA-mTL-B1ACCGA..... <u>AUG</u>aug	54 ± 1
	pA-mTL-B2C.CAU..... <u>AUG</u>aug	144 ± 22
	pA-mTL-B3AUUAG..... <u>AUG</u>aug	18 ± 6
	pA-mTL-B4 <u>AUG</u> AG..... <u>AUG</u>aug	8 ± 0
	pA-mTL-C1CGGGCA..... <u>AUG</u>aug	46 ± 15
	pA-mTL-C2AGGGCA..... <u>AUG</u>aug	71 ± 21
	pA-mTL-C3CGAACA..... <u>AUG</u>aug	90 ± 4
	pA-mTL-C4AAAGCA..... <u>AUG</u>aug	33 ± 0
	pA-mTL-D1UCAAG..... <u>AUG</u>aug	34 ± 12
	pA-mTL-D2ACAGG..... <u>AUG</u>aug	25 ± 9
	pA-mTL-D3UCAUC..... <u>AUG</u>aug	47 ± 7
	pA-mTL-D4UGAAC..... <u>AUG</u>aug	164 ± 13
	pA-mTL-E1UCAGCA <u>AUG</u>aug	67 ± 3
	pA-mTL-E2AUAGCA <u>AUG</u>aug	45 ± 3
	pA-mTL-E3--GCG <u>AUG</u>aug	4 ± 1
	pA-mTL-E4ACAGCA <u>AUG</u>aug	52 ± 14

B

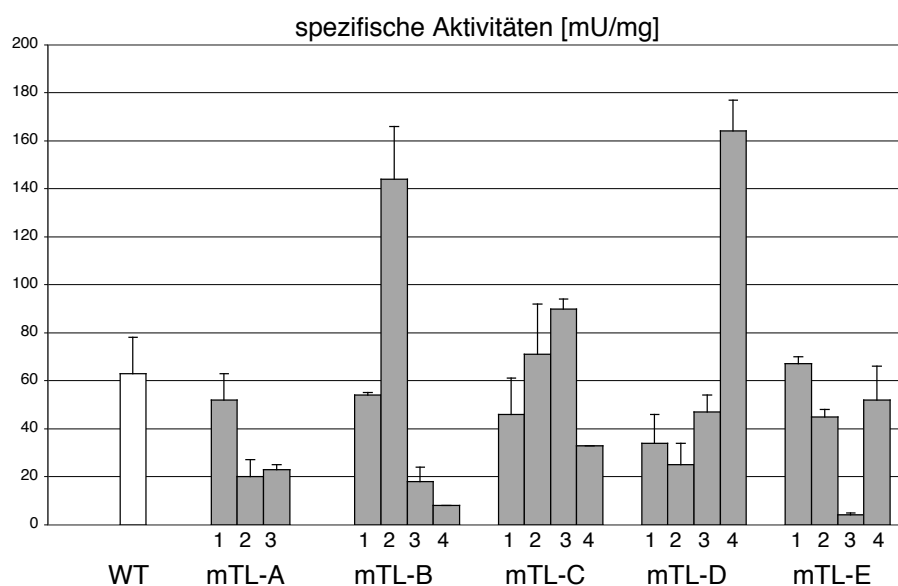


Abb. 23 (A) scanning-Mutagenese des p-*gvpA*-mRNA-leaders. Die Wildtyp-Sequenz ist oben angegeben. +1 markiert den Transkriptionsstart. Die an der stem-loop-Struktur beteiligten Nukleotide sind unterstrichen. Die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens sind fett und kursiv gedruckt, das AUG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens in Kleinbuchstaben. Die Sequenzen der verschiedenen mTL-Mutanten sind darunter angegeben. Identische Nukleotide mit dem WT sind durch Punkte dargestellt, zufällige durch die Mutationen erzeugte Startcodons sind unterstrichen, deletierte Nukleotide sind durch Striche dargestellt. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten sind rechts angegeben. **(B)** Graphische Darstellung der spezifischen Aktivitäten der Transformanten A-*bgaH*, mTL-A, -B, -C, -D und -E, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten. Die spezifischen Aktivitäten wurden nach 48 h Wachstum, bei einer OD_{600nm} von 1,8 bis 2,1 bestimmt und sind in [mU/mg] angegeben.

Zusammengefasst kann man sagen, dass auf Grund dieser Analysen kein bestimmter Sequenzbereich im mRNA-*leader* gefunden wurde, der die Translation maßgeblich beeinflusste. Auch die stem-loop-Struktur am 5'-Ende der mRNA schien keine Bedeutung für die Translation zu haben.

2.2 Untersuchungen des p-*gvpA*-mRNA-*leaders* mit dem GvpA-Protein als Reporter

Bereits früher durchgeführte Untersuchungen mit dem GvpA-Protein als Reporter, lieferten Hinweise darauf, dass eine Deletion von 6 nt im p-*gvpA*-mRNA-*leader* (Position +8 bis +13), wodurch der mRNA-*leader* sich von 20 auf 14 nt verkürzt und die Ausbildung der Sekundärstruktur verhindert wird, die Genexpression nicht beeinflusst (Sartorius-Neef, 2000). Um die Funktion des p-*gvpA*-mRNA-*leaders* zu untersuchen wurde der *leader*-Bereich der p-*gvpA*-mRNA vollständig deletiert. Um zu überprüfen, ob der veränderte mRNA-*leader* die Transkriptmenge beeinflusst, wurden Northern-Analysen durchgeführt. Durch Western-Analysen mit dem mcGV-Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993) wurde schließlich der Einfluss der Veränderungen im *leader*-Bereich auf die Translation überprüft.

Analysen mit p-*gvpA* als Reporter

Für die Herstellung des pA-*gvpA*-Konstruktes wurde das native p-*gvpA*-Gen inklusive dem P_A-Promotor mittels PCR amplifiziert und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Das ΔTL-*gvpA*-Konstrukt mit der internen Deletion von 6 nt an Position +8 bis +13 war bereits vorhanden (Sartorius-Neef, 2000). Bei dem Konstrukt ΔL-*gvpA* wurde der mRNA-*leader* vollständig deletiert, sodass die Transkription der daraus resultierenden *leader*-losen mRNA direkt 1 nt vor dem Startcodon des *gvpA*-Leserahmens begann (Abbildung 24).

	+1	→
pA- <i>gvpA</i>	<u>GGGUUAA</u> <u>UCC</u> CAGAUCAACCA AUG	
ΔTL- <i>gvpA</i>	GGGUUAA-----AUCACCA AUG	
ΔL- <i>gvpA</i>	G----- AUG	

Abb. 24 mRNA-*leader*-Sequenzen des p-*gvpA*-Gens (pA) und den beiden Mutanten ΔTL-*gvpA* und ΔL-*gvpA*. +1 markiert den Transkriptionsstart. Die an der am 5'-Ende gelegene stem-loop-Struktur beteiligten Nukleotide sind unterstrichen. Das AUG-Startcodon von p-*gvpA* ist fettgedruckt, deletierte Nukleotide sind mit einem Strich markiert.

Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mittels DNA-Sequenzanalysen überprüft. Die Konstrukte wurden anschließend zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet. Es

wurden Transformanten hergestellt, die jeweils das pA-*gvpA*, Δ TL-*gvpA* oder das Δ L-*gvpA*-Konstrukt im *shuttle*-Vektor pWL102 enthielten (zur Messung der basalen Aktivität) und Transformanten, die zusätzlich noch den p-*gvpE*-Leserahmen im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 enthielten. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und mittels Restriktionsanalyse auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Zunächst wurde für die Northern-Analyse aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase Zellen entnommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Zur Detektion der p-*gvpA*-mRNA wurde eine strangspezifische A-Sonde verwendet. Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA von *Hf. volcanii* WDF11 (Hv) isoliert. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte die Menge und Qualität der mRNA (Abbildung 25). Von den jeweiligen Transformanten wurden annähernd gleiche Mengen Gesamt-RNA aufgetragen. Mit Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* (Hv) hybridisierte die A-Sonde nicht. Die pA-*gvpA*-Transformante bildete das erwartete 270 nt lange *gvpA*-mRNA-Transkript, wobei in der Probe aus der exponentiellen Wachstumsphase mehr Transkript vorhanden war, als in der Probe aus der stationären Wachstumsphase (Abbildung 25). Die Δ TL-*gvpA*- und Δ L-*gvpA*-Transformante enthielten das *gvpA*-Transkript in etwa der gleichen Menge wie die pA-*gvpA*-Transformante. Auch hier war in der exponentiellen Probe mehr *gvpA*-Transkript vorhanden, als in der stationären Probe. Bei der Δ L-*gvpA*-Transformanten schien in der exponentiellen Wachstumsphase mehr des p-*gvpA*-Transkripts gebildet worden zu sein, dies lag daran, dass mehr Gesamt-RNA aufgetragen wurde (Abbildung 25). Bei den Transformanten pA-*gvpA*, Δ TL-*gvpA* und Δ L-*gvpA*, die zusätzlich den Transkriptionsaktivator p-*gvpE* exprimierten, wurde deutlich mehr der *gvpA*-mRNA detektiert. Das entsprach auch den Erwartungen, da GvpE den P_A -Promotor stimuliert (Gregor & Pfeifer, 2001). In der stationären Wachstumsphase wurde hier mehr Transkript gebildet als in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Δ TL-*gvpA*- und Δ L-*gvpA*-Transformante, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten bildeten in der stationären Wachstumsphase mehr *gvpA*-Transkript, als im Vergleich dazu die Transformante pA/pE^{Ex}. Neben der 270 nt langen *gvpA*-mRNA wurden noch weitere größere mRNAs detektiert.

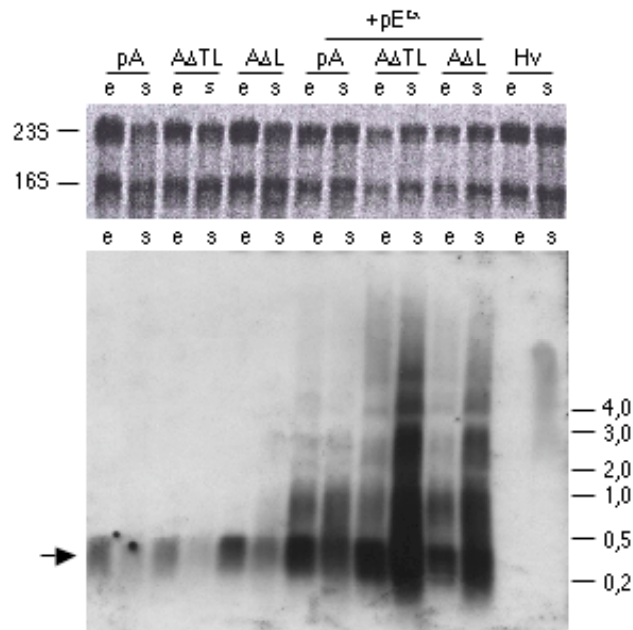


Abb. 25 Northern-Analyse zur Detektion der *p-gvpA*-mRNA in den Transformanten *pA-gvpA*, *ΔΔTL-gvpA*, *ΔΔL-gvpA* und den Transformanten, die zusätzlich *pE^{Ex}* besaßen, sowie von *Hf. volcanii*. Es wurden jeweils 5 μg Gesamt-RNA aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylblaugefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde als Kontrolle der Qualität und Quantität benutzt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Auf der rechten Seite sind die RNA-Größenstandards in kb angegeben. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen A-Sonde. Der Pfeil zeigt die 270 nt *gvpA*-mRNA.

Die Northern-Analyse zeigte, dass alle drei Transformanten ähnliche *p-gvpA*-mRNA Mengen bildeten und weder eine Verkürzung des *gvpA*-mRNA-*leaders* (*ATL-gvpA*-Transformante) von 20 auf 14 nt noch eine vollständige Deletion des mRNA-*leaders* (*ΔΔL-gvpA*-Mutante) einen Einfluss auf die Transkriptmenge hatte.

Für die Western-Analysen wurden Proben aus der stationären Wachstumsphase entnommen und die Proteine isoliert. Die Detektion des pGvpA-Proteins erfolgte mit dem mcGV-Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993). Als Kontrolle wurden die Proteine aus *Hf. volcanii* (Hv) verwendet. Das mcGV-Antiserum reagierte auch mit Proteinen aus *Hf. volcanii*, jedoch nicht mit Proteinen, die der Größe des GvpA-Proteins entsprachen (Abbildung 26). In der Probe der *ΔΔTL-gvpA*-Transformante wurde etwas mehr des monomeren und aggregierten GvpA-Proteins detektiert, als in den Proben der *pA-gvpA*- und *ΔΔL-gvpA*-Transformante. Die *pA-gvpA*-Transformante, die zusätzlich *p-gvpE* exprimiert (*pA/pE^{Ex}*), bildete etwas mehr GvpA-Protein, als die *pA-gvpA*-Transformante. In der Northern-Analyse wurde dagegen in der *pA/pE^{Ex}*-Transformante deutlich mehr der *p-gvpA*-mRNA gebildet, als von der *pA*-Transformante.

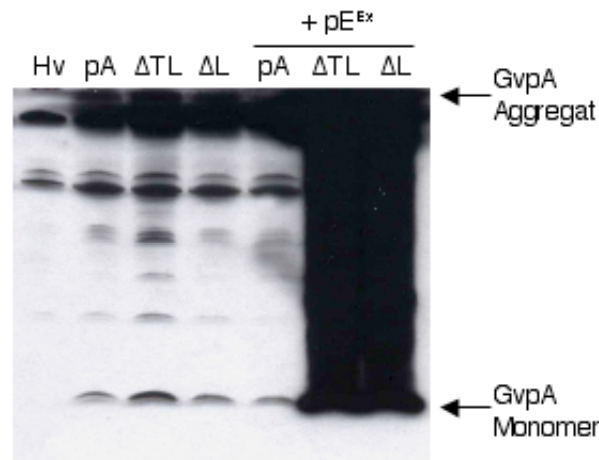


Abb. 26 Western-Analyse zur Detektion des p-GvpA-Proteins mit dem mcGV-Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993). Es wurden jeweils 20 μ g Gesamt-Protein aus der stationären Wachstumsphase der Transformanten mit den Konstrukten pA-*gvpA* (enthält p-*gvpA*), Δ TL-*gvpA* (enthält die 6 nt Deletion) und Δ DL-*gvpA* (enthält die vollständige Deletion des mRNA-*leaders*) aufgetragen. Der Pfeil zeigt das detektierte pGvpA-Protein als Monomer und Aggregat.

Ein Vielfaches mehr an GvpA-Protein wurde dagegen in den Proben der Δ TL-*gvpA*/pE^{Ex}- und Δ DL-*gvpA*/pE^{Ex}-Transformante detektiert. In der Northern-Analysen wurde die *gvpA*-mRNA in der Probe aus der stationären Wachstumsphase bei den Transformanten Δ TL-*gvpA* und Δ DL-*gvpA*, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten in größeren Mengen detektiert im Vergleich zur pA-*gvpA*/pE^{Ex}-Transformante, allerdings unterschieden sich die mRNA-Mengen nicht so sehr, wie die Mengen an GvpA-Protein. Diese Analysen zeigten, dass sowohl die mRNA mit dem verkürzten mRNA-*leader*, als auch die *leader*-lose mRNA viel effizienter translatiert wurden. Eine genaue Quantifizierung des gebildeten GvpA-Proteins war aber nicht möglich.

2.3 Untersuchungen des p-*gvpA*-mRNA-*leaders* mit dem *bgaH*-Reportergen

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und die Produktmenge zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Fusionskonstrukte mit dem *bgaH*-Reportergen hergestellt. Diese enthalten die P_A-Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, den *gvpA*-mRNA-*leader* (A-*bgaH*), den verkürzten mRNA-*leader* (Δ TL_A-*bgaH*) bzw. keinen mRNA-*leader* (Δ L_A-*bgaH*), die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens und daran fusioniert den *bgaH*-Leserahmen als Reporter (Abbildung 27). Die Fusionsproteine enthalten demnach alle am N-terminus die ersten 6 Aminosäuren MAQPDS² des GvpA-Proteins. Das A-*bgaH*-Konstrukt war bereits vorhanden (Gregor & Pfeifer, 2001). Die beiden anderen Fragmente Δ TL_A-*bgaH* und Δ L_A-*bgaH* wurden mittels PCR hergestellt und in den pBluescript II Sk(+) Vektor, der bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt, inseriert. Anschließend wurden die Fragmente als komplettes

² Aminosäuren MAQPDS: M=Met, A=Ala, Q=Gln, P=Pro, D=Asp, S=Ser

Fusionskonstrukt in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mittels DNA-Sequenzanalysen überprüft.

<i>A-bgaH</i>	⁺¹ GGGUUAA <u>UCC</u> CAGAUCCACCA <u>AUGGCGCAACCAGAUUCC</u> aug
Δ TL _A - <i>bgaH</i>	GGGUUAA-----AUCACCA <u>AUG</u>aug
Δ L _A - <i>bgaH</i>	G----- <u>AUG</u>aug

Abb. 27 mRNA-*leader*-Sequenzen des p-*gvpA-bgaH*-Fusionskonstrukts (*A-bgaH*) und der beiden Mutanten Δ TL_A-*bgaH* und Δ L_A-*bgaH*. +1 markiert den Transkriptionsstart. Die an der stem-loop-Struktur beteiligten Nukleotide sind unterstrichen. Die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens sind fett und kursiv gedruckt, das AUG-Startcodon des *bgaH*-Leserahmens in Kleinbuchstaben.

Die jeweiligen Konstrukte wurden zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet. Es wurde sowohl die basale Aktivität, als auch die durch GvpE vermittelte Aktivität gemessen. Es wurden daher jeweils Transformanten hergestellt, die nur das pWL-Konstrukt *A-bgaH*, Δ TL_A-*bgaH* bzw. Δ L_A-*bgaH* enthielten und Transformanten, die zusätzlich noch den p-*gvpE*-Leserahmen im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 enthielten. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und mittels Restriktionsanalyse auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Um zu überprüfen, ob der veränderte mRNA-*leader* die Menge der *bgaH*-mRNA beeinflusst, wurden zunächst Northern-Analysen durchgeführt, anschließend wurde die spezifische Aktivität der BgaH bestimmt

Analysen mit dem *bgaH*-Gen als Reporter

Für die Northern-Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Proben der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert. Für die Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA von *Hf. volcanii* (Hv) verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte Menge und Qualität der mRNA (Abbildung 28). Es zeigte sich, dass von allen Transformanten annähernd gleiche Mengen Gesamt-RNA aufgetragen wurde. Mit Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* hybridisierte die *bgaH*-Sonde nicht. Die 2,2 kb lange *bgaH*-mRNA konnte bei allen Transformanten detektiert werden (Abbildung 28). Bei den Transformanten *A-bgaH*, Δ TL_A-*bgaH* und Δ L_A-*bgaH* wurde in den stationären Proben mehr Transkript detektiert, als in den Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase. Die Δ L_A-*bgaH*-Transformante bildete exponentiell etwas mehr der *bgaH*-mRNA als die *A-bgaH*- und Δ TL_A-*bgaH*-Transformante. Die Transformanten, die zusätzlich p-*gvpE* exprimieren bilden mehr Transkript, als die Transformanten ohne p-*gvpE*. Dies entspricht den Erwartungen, da GvpE den P_A-Promotor stimuliert. Sowohl exponentiell als auch stationär bildete die A/pE^{Ex}-Transformante mehr

bgaH-mRNA als $\Delta TL_A/pE^{Ex}$ und $\Delta L_A/pE^{Ex}$. Dies könnte an leichte Schwankungen beim Auftragen der RNA-Menge gelegen haben.

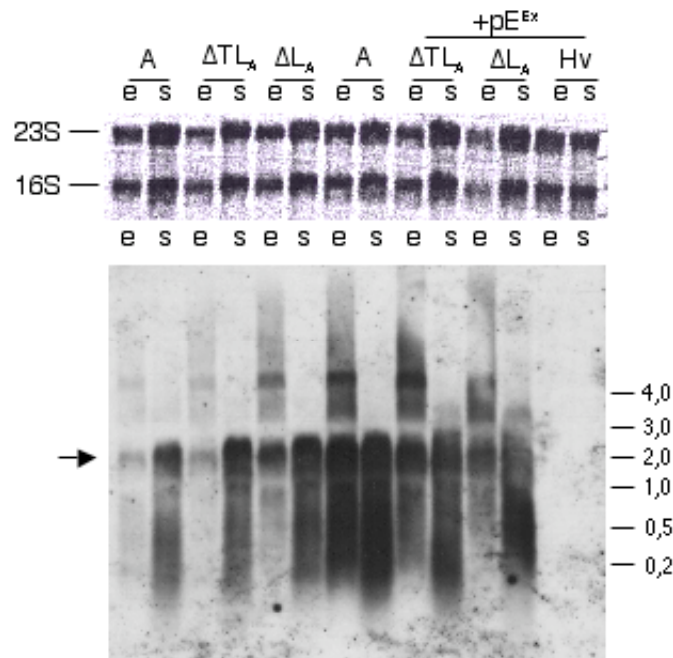


Abb. 28 Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in den Transformanten, die das Konstrukt A-*bgaH*, ΔTL_A -*bgaH*, ΔL_A -*bgaH* enthielten, sowie den Transformanten, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase aufgetragen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde als Kontrolle der Qualität und auch der Menge an RNA benutzt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Auf der rechten Seite sind die RNA-Gößenstandards in kb angegeben. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Der Pfeil zeigt die Lage der 2,2 kb mRNA.

Bei der $\Delta L_A/pE^{Ex}$ -Transformante wurde exponentiell weniger der *bgaH*-mRNA detektiert, als im Vergleich zu $\Delta TL_A/pE^{Ex}$ und A/ pE^{Ex} . Auch hier erkannte man auf der Methylenblau-gefärbten Nylonmembran, dass etwas weniger Gesamt-RNA aufgetragen wurde. Bezieht man die Schwankungen der Gesamt-RNA Menge mit ein, kann man sagen, dass die Transformanten A-*bgaH*, ΔTL_A -*bgaH* und ΔL_A -*bgaH* gleiche Mengen des *bgaH*-Transkripts bildeten, ebenso die Transformanten, die zusätzlich p-*gvpE* exprimierten. Die Menge an *bgaH*-Transkript wird somit nicht verändert, wenn der mRNA-*leader* verkürzt oder gar nicht vorhanden ist.

Anschließend wurde der Wachstumsverlauf und die spezifische Aktivität der BgaH bestimmt. Abbildung 29 zeigt den typischen Wachstumsverlauf und die spezifischen Aktivitäten der BgaH am Beispiel einer *Hf. volcanii*-Transformante, die das *bgaH*-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des P_A-Promotors exprimierte und zusätzlich den Transkriptionsaktivator p-*gvpE* exprimierte. Es zeigte sich, dass der P_A-Promotor sowohl in der exponentiellen als auch

stationären Wachstumsphase aktiv war. Die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase nahm während dem gesamten Wachstum stetig zu, wobei stationär die BgaH-Aktivität nicht mehr ganz so stark zunahm, wie in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 29).

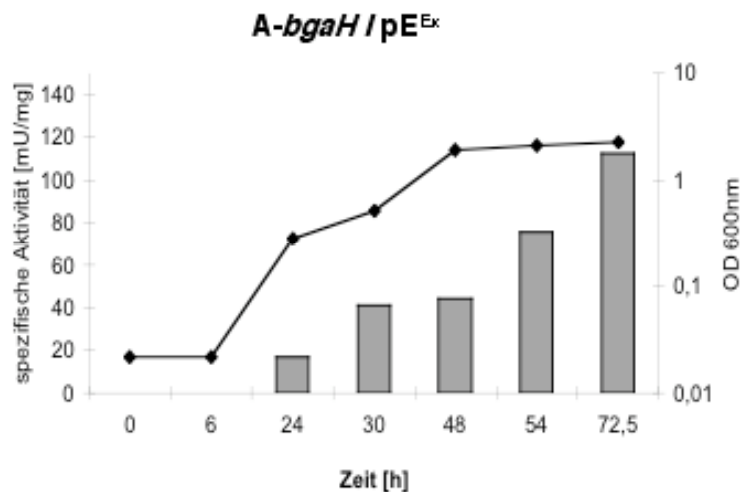


Abb. 29 Wachstumskurve und spezifische Aktivität der β -Galaktosidase der *A-bgaH/pE^{Ex}*-Transformante. Die optische Dichte (OD_{600nm}) und die spezifische Aktivität [mU/mg] sind gegenüber der Zeit aufgetragen.

Um die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Transformanten untereinander vergleichen zu können, wurde die spezifische Aktivität nach 48 h Wachstum bei einer OD_{600nm} von 1,8 bis 2,1 gemessen. Es wurde jeweils für zwei verschiedene Transformanten mit dem gleichen Konstrukt die spezifische Aktivität 3- bis 6-mal bestimmt, die jeweiligen spezifischen Aktivitäten gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt. Die gemittelte spezifische BgaH-Aktivität für die basale P_A-Promotoraktivität der *A-bgaH*-Transformante lag bei $1 \pm 0,6$ mU/mg (Abbildung 30) und stimmte gut mit den Ergebnissen aus früheren Messungen überein (Gregor & Pfeifer, 2001). Bei der Δ TL_A-*bgaH*-Transformante war die spezifische Aktivität durchschnittlich 40fach erhöht und lag bei 38 mU/mg (Abbildung 30). Bei der Δ L_A-*bgaH*-Transformante, war die spezifische Aktivität im Mittel 100fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp und lag bei 128 mU/mg. Für die durch GvpE vermittelte Aktivierung wurde eine spezifische Aktivität von 98 ± 53 mU/mg für die WT-Transformante gemessen (Abbildung 30). Für die Δ TL_A-*bgaH*-Transformante war die spezifische Aktivität 5fach erhöht und lag bei 547 mU/mg. Die der Δ L_A-*bgaH*-Transformante war 15fach erhöht und lag somit bei 1429 mU/mg (Abbildung 30).

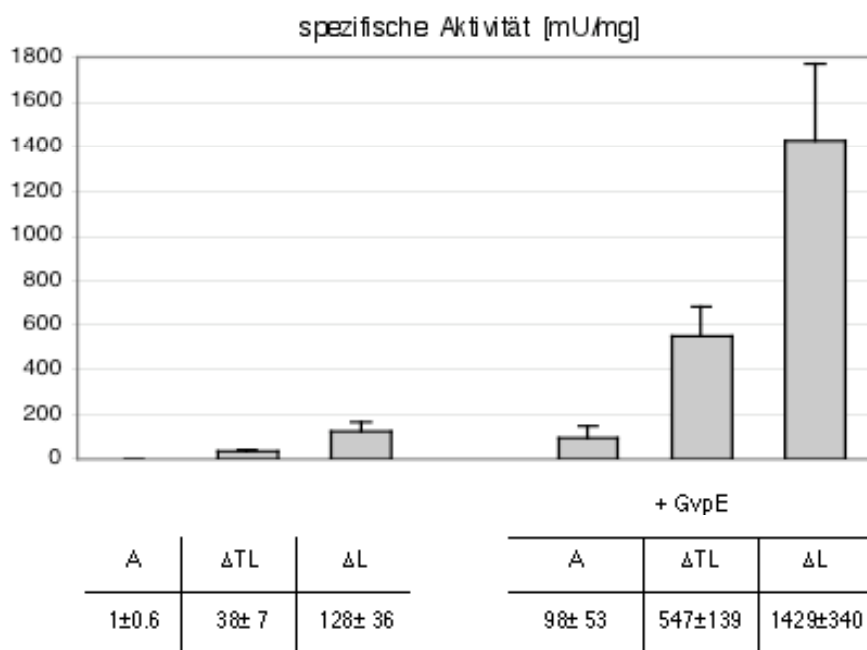


Abb. 30 Gemittelte spezifische β -Galaktosidase-Aktivitäten der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den *A-bgaH*, ΔTL_A -*bgaH* und ΔL_A -*bgaH*-Konstrukten und den Transformanten, die zusätzlich *p-gvpE* exprimierten. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten wurden nach 48 h bei einer OD_{600nm} von 1,8 bis 2,1 bestimmt.

Die gemessenen spezifischen Aktivitäten am P_A -Promotor zeigten ähnliche Ergebnisse, wie zuvor die Untersuchungen mit dem *gvpA*-Leserahmen als Reporter. Eine Verkürzung des mRNA-*leaders* bzw. die vollständige Deletion des mRNA-*leader*-Bereichs führen zu einer starken Erhöhung der Translation dieser Transkripte.

3. Untersuchung der Translation von *leader*-losen mRNAs

Leader-lose RNAs findet man in allen drei Domänen des Lebens, wobei der Anteil mit 30% in Archaea am höchsten ist (Sensen *et al.*, 1996; Slupska *et al.*, 2001). Die Initiation der Translation kann nicht von mRNA-rRNA-Wechselwirkung abhängen, es muss daher noch einen weiteren Mechanismus geben, wie *leader*-lose mRNAs vom Ribosom erkannt werden (O'Connor *et al.*, 1999; La Taena *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2001 und 2002). Die bereits untersuchten *leader*-losen Konstrukte Δ lead (Kapitel 1.3) und Δ L_A-*bgaH* (Kapitel 2.3) haben gezeigt, dass *leader*-lose mRNAs effizienter, im Vergleich zur jeweiligen *leader*-haltigen mRNA translatiert werden. Um nun zu prüfen, ob der mRNA-*leader* möglicherweise einen negativen Effekt auf die Translation ausübt, wurden weitere *leader*-lose mRNAs getestet. Für diese Untersuchungen wurde der mRNA-*leader* von *p-gvpD* und *p-gvpF* der *p-vac*-Region deletiert, die alle wie *p-gvpA* ursprünglich mit einem mRNA-*leader* hergestellt werden. Die *p-gvpD*-mRNA enthält einen 71 nt langen mRNA-*leader* und die *p-gvpF*-mRNA einen 169 nt langen mRNA-*leader* (DaSarma *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1989; Offner & Pfeifer, 1995).

Weiterhin wurde mit Hilfe der basalen Aktivität die Promotorstärke der vier *p-vac*-Promotoren bestimmt. Dazu wurden die Konstrukte so hergestellt werden, dass die daraus resultierenden *leader*-losen mRNAs und auch die *BgaH* identisch waren und nur der aufwärts gelegene Promotorbereich verschieden war.

3.1 Deletion des mRNA-*leaders* von *p-gvpA*, *p-gvpD* und *p-gvpF*

Für die Herstellung der *leader*-haltigen Konstrukte wurde jeweils die Promotorregion von P_A, P_D, bzw. P_F, bis zum Transkriptionsstart, der mRNA-*leader* und die ersten 18 nt des *p-gvpA*-Gens mit dem Reportergen fusioniert (Abbildung 31). Für die *leader*-losen Konstrukte wurden die jeweiligen mRNA-*leader* deletiert (Abbildung 31). Das *A-bgaH* und das Δ L_A-*bgaH*-Konstrukt waren bereits vorhanden und wurde bereits für die Untersuchungen in Kapitel 2.3 verwendet. Die jeweiligen Konstrukte wurden so hergestellt, dass die von diesen Konstrukten synthetisierten Fusionsproteine identisch waren. Diese besitzen am N-Terminus die ersten 6 Aminosäuren MAQPDS³ des *p-gvpA*-Gens. Aus früheren Experimenten war bereits bekannt, dass die ersten 6 Aminosäuren von *p-gvpA* am N-Terminus die β -Galaktosidase-Aktivität nicht negativ beeinflussen (Gregor & Pfeifer, 2001).

³ Aminosäuren MAQPDS: M=Met, A=Ala, Q=Gln, P=Pro, D=Asp, S=Ser

A

Promotor	DNA-Sequenz
P_A	<u>TCTAGAAGTACGACTCATTACAGGAGACATAACGACTGGTGA</u> <u>AACCATACACAT</u> CCTTATG TGATGCCCCGAGTATAGTTAGAGATGGGTTAATCCCAGATCACCA ATG GCGCAACCAGATTCCATG - <i>bgaH</i>
P_D	<u>TCTAGATTACACAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCGTACTTCTAAGTACGG</u> AGAGTGTAAGCTTCTTAGACAGTCGTGAAGCGAAGAAAGCCTCACCTACTAGTCCG GAGTGCTCTACCGCCATCGACTGGAGAGAAGTA ATGGCGCAACCAGATTCCATG - bgaH
P_F	<u>TCTAGAATCTCCGGCGGCTGTTTGGGGCAGACCTGAGTCCGGGTACAGTATACC</u> CGC ATTTAAAT GACCTTGCAGTCGAAGGTGTACTTGAGGTACAGAAATTGAGCAAGC GCAAAGTGTATCGCCTCTCCGATCCTGAAGGAGCGTTCACCCGAATAGACCACATGG TTGATCAGTTGCTGCTGTTTTTCGCTCGTACTCAAGGCGGTTATGACCGATTGCAAGG CGCGTCAATCACAATCCCAAGGAAGAGAGACCA ATGGCGCAACCAGATTCCATG - bgaH

B

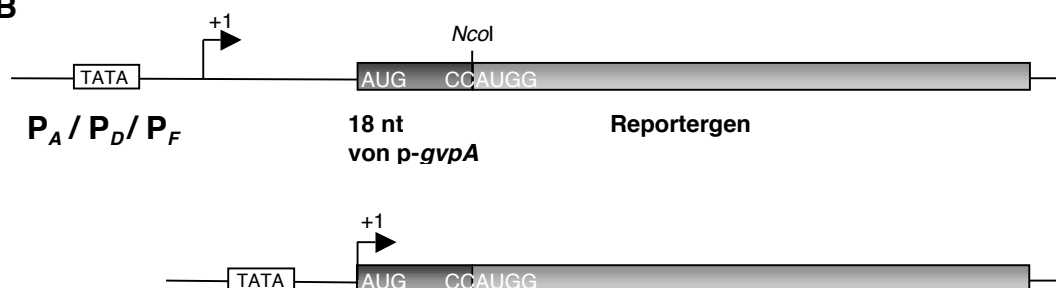


Abb. 31 (A) DNA-Sequenz des P_A , P_D - und P_F -Fusionsbereichs. Die Restriktionsschnittstelle, die zur Klonierung verwendet wurde, ist unterstrichen dargestellt, die TATA-Box des Promotors fettgedruckt, der mRNA-leader ist hellgrau, das Startcodon und die ersten 18 nt von *gvpA* sind fett- und kursiv gedruckt, das Startcodon des Reporters ist fett- und unterstrichen dargestellt. **(B)** Schematische Darstellung der P_A , P_D , bzw. P_F -Fusionskonstrukte im Expressionsvektor pJAS35. +1 bezeichnet den Transkriptionsstart. Die TATA-Box des Promotors ist als Kasten mit TATA dargestellt.

Die *D-bgaH*, Δ_{L_D} -*bgaH*, *F-bgaH*, und Δ_{L_F} -*bgaH*-Fragmente wurden mittels PCR hergestellt, als Matrize wurde die p-vac-Region verwendet. Zunächst wurden die Fragmente in den pBluescript II Sk(+) Vektor, der bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt, inseriert. Anschließend wurden die Sequenzen als komplettes Fusionskonstrukt in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert. Die Richtigkeit der Fusion und Sequenz wurde mittels DNA-Sequenzanalyse bestimmt. Die jeweiligen Konstrukte (*A-bgaH*, Δ_{L_A} -*bgaH*, *D-bgaH*, Δ_{L_D} -*bgaH*, *F-bgaH* und Δ_{L_F} -*bgaH*) wurden zur Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 verwendet. Zur Kontrolle wurden auch Transformanten hergestellt, die jeweils das pD oder pF-Konstrukt enthielten. Diese Konstrukte waren bereits vorhanden und unterscheiden sich vom *D-bgaH* und *F-bgaH*-Konstrukt nur dadurch, dass pD die ersten 5 Codons des *gvpD*-Gens und pF die ersten 5 Codons des *gvpF*-Gens enthält (Hofacker *et al.*, 2004), während *D-bgaH* und *F-bgaH* jeweils die ersten 6 Codons des p-*gvpA*-Gens enthalten. Es wurde

geprüft, ob das *D-bgaH* und pD-Konstrukt bzw. das *F-bgaH* und pF-Konstrukt unterschiedliche *bgaH*-Transkriptmengen bildeten. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und durch Southern-Analyse überprüft. Es wurden Northern-Analysen durchgeführt, um die Transkriptmenge der *bgaH*-mRNA in den jeweiligen Transformanten zu prüfen und die spezifische Aktivität der BgaH bestimmt, um den Einfluss des mRNA-*leaders* auf die Translation zu untersuchen.

Analyse der verschiedenen P_A -, P_D - und P_F -Transformanten

Zunächst wurde für die Northern-Analysen Gesamt-RNA aus Zellen der exponentiellen und stationären Wachstumsphase isoliert. Zur Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische *bgaH*-Sonde verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte, die Menge und Qualität der mRNA (Abbildung 32). Es zeigte sich, dass von den RNA-Präparationen der *A-bgaH*-Transformante und pD-Transformante aus der exponentiellen Wachstumsphase weniger, von der ΔL_A -*bgaH*-Transformante aus der stationären Wachstumsphase mehr Gesamt-RNA aufgetragen wurde, im Vergleich zur aufgetragenen RNA-Menge der restlichen Proben (Abbildung 32). Von allen anderen Transformanten wurden annähernd gleiche Mengen Gesamt-RNA aus den beiden Wachstumsphasen der Transformanten aufgetragen.

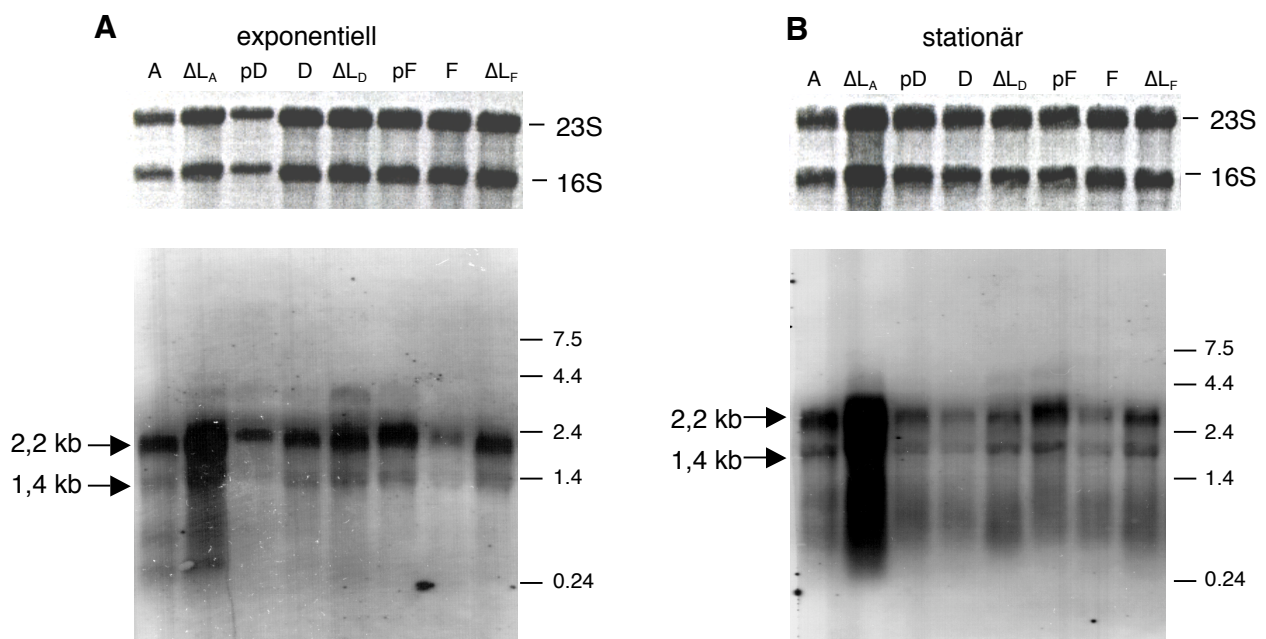


Abb. 32 Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in den Transformanten *A-bgaH*, ΔL_A -*bgaH*, pD, *D-bgaH*, ΔL_D -*bgaH*, pF, *F-bgaH* und ΔL_F -*bgaH*. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamt-RNA aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der Transformanten aufgetragen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran oben zeigt die 23S und 16S rRNA und wurde als Kontrolle der Qualität und Quantität benutzt. Die Northern-Analyse ist darunter gezeigt. Die RNA wurde über ein 1,2%iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Die RNA-Größenstandards sind jeweils rechts in kb angegeben. Der Pfeil zeigt die Größe der *bgaH*-mRNA.

Bei allen Transformanten konnte die *bgaH*-mRNA detektiert werden, sowie eine kleinere mRNA mit einer Länge von 1,4 kb. Das kleinere Transkript entstand möglicherweise durch vorzeitige Termination, es könnte sich auch um ein Abbauprodukt handeln (Holmes & Dyall-Smith, 2000). Die *bgaH*-Transkriptmenge der *A-bgaH*-Transformante unterschied sich nicht wesentlich von der Transkriptmenge der Transformante, die das ΔL_A -*bgaH*-Konstrukt besaß. Die unterschiedlich starken Signale der *bgaH*-Sonde sind darauf zurück zu führen, dass nicht identische Mengen Gesamt-RNA aufgetragen wurden, was auf der Methylenblau-gefärbten Nylonmembran deutlich zu sehen war (Abbildung 32). Die Transkriptmenge der *bgaH*-mRNA der pD-, D- und ΔL_D -Transformante war jeweils in der gleichen Menge vorhanden. Allerdings wurde exponentiell mehr Transkript gebildet als stationär. Auf Transkriptionsebene schien es demnach keinen Unterschied zu machen, ob nach dem AUG-Startcodon die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Gens oder die ersten 15 nt des p-*gvpD*-Leserahmens vorhanden waren. Auch der *gvpD*-mRNA-*leader* schien keinen Einfluss auf die Transkriptmenge zu haben. Bei der F-*bgaH*-Transformante zeigte sich, dass sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase weniger des Transkripts gebildet wurde, im Vergleich zur Transkriptmenge der pF- und ΔL_F -*bgaH*-Transformante. Insgesamt bildeten die pF- und ΔL_F -Transformante exponentiell mehr des *bgaH*-Transkripts als stationär, was auch erwartet wurde, da der P_F -Promotor nur exponentiell aktiv ist. Die Northern-Analyse zeigte, dass der *gvpF*-mRNA-*leader* die Transkriptstabilität anscheinend beeinflusste. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Transkriptmenge mit Ausnahme von F-*bgaH* und ΔL_F -*bgaH* nicht sehr stark variierte zwischen den Transformanten, mit *leader*-haltiger oder *leader*-loser *bgaH*-mRNA. Der mRNA-*leader* schien keinen großen Einfluss auf die Transkriptmenge zu haben.

Überprüfen der β -Galaktosidase-Aktivität mit X-Gal und Quantifizierung mittels ONPG

Die einzelnen *Hf. volcanii* Transformanten wurden kreuzförmig auf Agarplatten ausgestrichen und zunächst mit X-Gal besprüht, um die β -Galaktosidase-Aktivität auf der Kolonieebene sichtbar zu machen. Die *A-bgaH*-Transformante war leicht blau gefärbt, auf Grund der niedrigen basalen Aktivität des P_A -Promotors (Abbildung 33). Die Transformante mit dem ΔL_A -*bgaH*-Konstrukt war im Vergleich dazu dunkelblau gefärbt, was bereits andeutete, dass die *leader*-lose mRNA zu mehr Genprodukt führte und somit stärker translatiert wird. Dass die *leader*-lose *gvpA*-mRNA der ΔL_A -*bgaH*-Transformante besser translatiert wird, wurde bereits mit dem *bgaH*-Gen als Reporter in Kapitel 2.3 gezeigt. Die D-Transformante blieb orange-rot gefärbt (Abbildung 33), was bedeutete, dass obwohl die *bgaH*-mRNA hier nachweisbar war, keine BgaH oder inaktive BgaH synthetisiert wurde. Möglich ist auch, dass die BgaH-Menge zu gering war, sodass es zu keiner Blaufärbung der Kolonie durch X-Gal

kam. Im Vergleich dazu war die ΔL_D -*bgaH*-Transformante schwach bläulich gefärbt. Dies zeigte, dass die *leader*-lose ΔL_D -*bgaH*-mRNA in geringen Mengen translatiert wurde. Die F-*bgaH*-Transformante blieb ebenfalls orange-rot gefärbt (Abbildung 33), dies bedeutet, dass keine β -Galaktosidase-Aktivität mittels X-Gal nachweisbar war, oder keine Translation stattfand. Die Northern-Analyse zeigte bereits, dass die F-*bgaH*-Transformante nur geringe Mengen des *bgaH*-Transkripts bildete. Die ΔL_F -*bgaH*-Transformante war nach dem Besprühen mit X-Gal blau gefärbt. Auch hier zeigte sich, dass das Transkript ohne den *gvpF*-mRNA-*leader* besser translatiert wurde, als das Transkript mit dem mRNA-*leader*. Zusammenfassend kann man sagen, dass in diesem Schnelltest die *leader*-losen mRNAs stärker translatiert wurden, als die mRNAs, die den jeweiligen mRNA-*leader* besaßen.

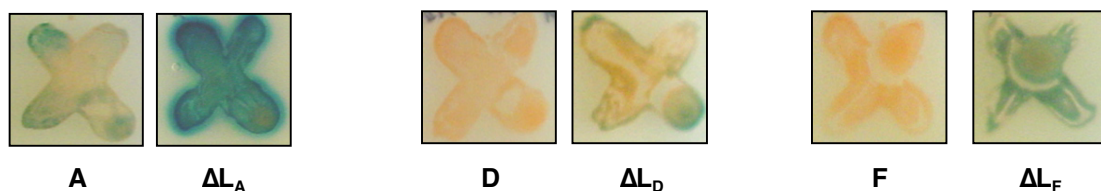


Abb. 33 X-Gal besprühte *Hf. volcanii*-Transformanten, die jeweils das P_A -, P_D - oder P_F -Promotorkonstrukt mit und ohne mRNA-*leader* enthalten. Die Kolonien wurden mit 10 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid besprüht und über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Blaufärbung der Kolonien ist ein Maß für die BgaH-Aktivität.

Um die β -Galaktosidase-Aktivität zu quantifizieren, wurde von allen Transformanten Wachstumskurven aufgenommen und nach 48 h Wachstum bei einer durchschnittlichen OD_{600nm} von 1,8 die spezifischen BgaH-Aktivitäten mittel ONPG bestimmt.

Tabelle 4 Spezifische β -Galaktosidase-Aktivität der Transformanten A-*bgaH*, ΔL_A -*bgaH*, D-*bgaH*, ΔL_D -*bgaH* und F-*bgaH*, ΔL_F -*bgaH*,.

Transformante	A	ΔL_A	D	ΔL_D	F	ΔL_F
BgaH-Aktivität [mU/mg]	$1,0 \pm 0,3$	104 ± 40	n.m.	$1,3 \pm 0,5$	n.m.	$5,0 \pm 1,6$

* Die BgaH-Aktivität wurde nach einem Wachstum von 48 h und einer $OD_{600} = 1,8$ bestimmt.

Die spezifische Aktivität der A-*bgaH*- und ΔL_A -*bgaH*-Transformante wurden erneut ermittelt (Tabelle 4) und stimmte gut mit den vorgestellten Werten im vorangegangenen Versuch aus Kapitel 2.3 überein. Im Vergleich zur A-*bgaH*-Transformante war die spezifische Aktivität der ΔL_A -*bgaH*-Transformante um das 100fache erhöht. Für die D-*bgaH*-Transformante konnte auch mittels ONPG keine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Für die ΔL_D -

bgaH-Transformante wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 1,3 mU/mg bestimmt (Tabelle 4). Die Ergebnisse stimmen gut mit den Analysen mittels X-Gal überein. Für die F-*bgaH*-Transformante konnte ebenfalls keine β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt werden. Die durchschnittliche spezifische Aktivität für die ΔL_F -*bgaH*-Transformante lag bei 5 mU/mg (Tabelle 4). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *leader*-losen mRNAs in allen drei Fällen besser translatiert wurden, als die gleichen mRNAs mit dem jeweiligen mRNA-*leader*.

3.2 Vergleich der verschiedenen p-vac-Promotoraktivitäten

In früheren Experimenten wurde die Aktivität der vier verschiedenen p-vac-Promotoren auf RNA-Ebene und mit der BgaH als Reporter bereits untersucht (Hofacker *et al.*, 2004). Auf mRNA-Ebene ist der P_A -Promotor der stärkste der vier p-vac-Promotoren, gefolgt vom P_O -, P_F - und P_D -Promotor. Allerdings konnte für den P_O -Promotor keine β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden (Hofacker *et al.*, 2004). Die dafür verwendeten Konstrukte wurden so hergestellt, dass sie jeweils die nativen Promotorregionen von P_A , P_D , P_F und P_O , bis zum Transkriptionsstart, den mRNA-*leader* und die ersten 15 nt des jeweiligen Leserahmens fusioniert an den *bgaH*-Leserahmen enthielten. Die daraus resultierenden mRNAs unterscheiden sich somit im jeweiligen mRNA-*leader* und in den ersten 15 nt des jeweiligen Leserahmens. Die daraus jeweils resultierenden BgaH-Proteine unterschieden sich dadurch in den ersten 5 Aminosäuren am N-Terminus, da diese vom jeweiligen *gvp*-Gen kodiert an den *bgaH*-Leserahmen fusioniert wurden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen mRNA-*leader* die mRNA-Stabilität und/oder die verschiedenen N-Termini der β -Galaktosidase die Enzymaktivität beeinflussen.

Um die vier p-vac-Promotoren erneut untereinander zu vergleichen, wurden die Konstrukte, aus denen die *leader*-losen mRNAs resultieren, aus Versuch 3.1 verwendet. Zusätzlich wurde auch das p-*gvpO*-Gen in die Analyse einbezogen, von dem ebenfalls ein *bgaH*-Fusionskonstrukt hergestellt wurde, dass die P_O -Promotorregion enthält plus die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens. Das p-*gvpO*-Gen wird monocistronisch transkribiert und der Transkriptionsstart liegt 1 nt stromaufwärts des Startcodons (Offner *et al.*, 1996). Bei allen vier p-vac-Promotoren sind deshalb die jeweils gebildeten *leader*-losen mRNAs und die daraus resultierenden BgaH-Proteine identisch und die gemessene BgaH-Aktivität kann direkt auf die jeweilige Promotorstärke zurückgeführt werden. Zum Vergleich wurden nochmals die A-*bgaH*, D-*bgaH* und F-*bgaH*-Konstrukte, die bereits in Kapitel 3.1 untersucht wurden, verwendet.

Bestimmung der Promotorstärke der vier p-vac-Promotoren

In der unten angefügten Tabelle sind die spezifischen Aktivitäten der β -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Transformanten zusammengefasst (Tabelle 5). Dieses Experiment, stimmte weitestgehend mit den bereits vorhandenen Ergebnissen überein, nämlich dass der P_A -Promotor der stärkste der vier p-vac-Promotoren ist, gefolgt von P_F , P_D und P_O .

Nach den hier ermittelten Daten schien die Aktivität des P_O -Promotors in derselben Größenordnung zu liegen wie diejenige des P_D -Promotors.

Tab. 5 Die spezifischen BgaH-Aktivitäten der jeweiligen *Hf. volcanii*-Transformanten.

Konstrukt	spez. Aktivität [mU/mg]	
	+ mRNA leader	leaderlos
<i>A-bgaH</i> und ΔL_A - <i>bgaH</i>	$1,0 \pm 0,3$	104 ± 40
<i>D-bgaH</i> und ΔL_D - <i>bgaH</i>	n.m.	$1,3 \pm 0,5$
<i>F-bgaH</i> und ΔL_F - <i>bgaH</i>	n.m.	$5,0 \pm 1,6$
<i>O-bgaH</i>	--	$1,0 \pm 0,4$

* Die Transformanten wurden in 3 M NaCl-Medium inkubiert, die BgaH-Aktivität nach einem Wachstum von 48 h und einer $OD_{600} = 1,8$ bestimmt.

4. Konstruktion eines Vektors zur Überexpression von p-gvpE

Das pGvpE-Protein aus *Hb. salinarum* PHH1 ist 21 kDa groß und auf Aminosäureebene zu 70 % identisch mit cGvpE und zu 71% mit mcGvpE (Horne *et al.*, 1991). Die Proteine cGvpE und mcGvpE sind nur zu 62% identisch auf Proteinebene. Die Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes des GvpE-Proteins zeigt große Ähnlichkeit zu eukaryotischen Transkriptionsaktivatoren der Familie der basischen Leucinezipper-Proteinen (bZIP) (Krüger *et al.*, 1998). Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass der P_A -Promotor durch den Transkriptionsaktivator pGvpE aktiviert wird (Gregor & Pfeifer, 2001). Mit Hilfe des *bgaH*-Reportergens konnte eine Aktivierung des P_A -Promotors durch pGvpE um das 10 bis 20fache bestimmt werden (Gregor & Pfeifer, 2001; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004). Aufgrund der Ergebnisse aus den vorausgegangenen Versuchen, dass *leader*-lose mRNAs sehr effizient translatiert werden und pGvpE den P_A -Promotor aktiviert, wurde ein Vektor zur Überexpression von p-gvpE konstruiert. Dazu wurde die P_A -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart direkt mit dem als *leader*-lose mRNA transkribierten p-gvpE-Leserahmen fusioniert (Abbildung 34).

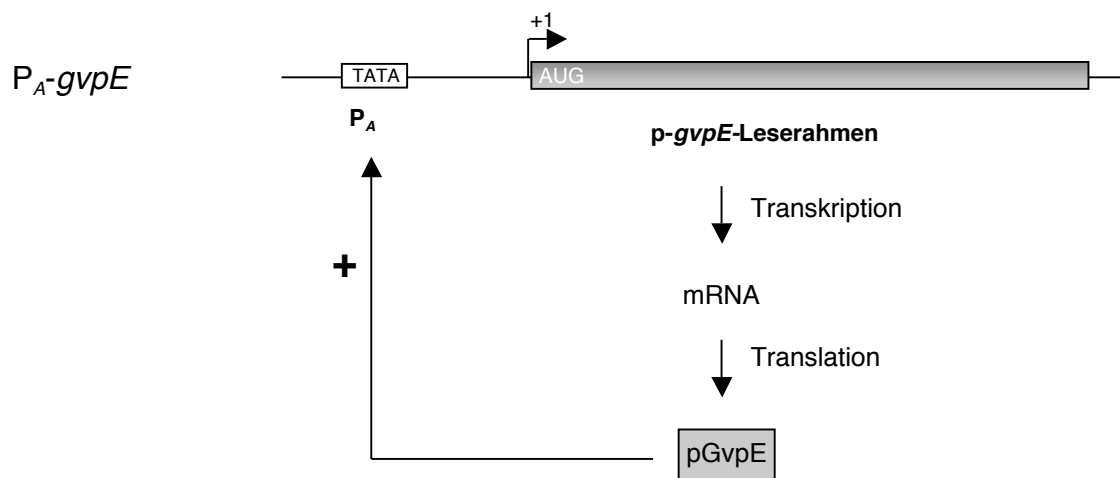


Abb. 34 Schematische Darstellung der P_A -Promotor+p-gvpE-Leserahmenfusion und der Aktivierung des P_A -Promotors durch den Transkriptionsaktivator pGvpE. +1 markiert den Transkriptionsstart. Die TATA-Box des Promotors ist als Kasten mit TATA dargestellt.

Durch die autokatalytische Aktivierung von pGvpE auf den P_A -Promotor sollten ausreichende Mengen pGvpE *in vivo* synthetisiert werden können. Letztendlich sollte nach proteinchemischer Aufreinigung ausreichende Mengen an pGvpE-Protein zur Verfügung stehen, um es für Kristallisationszwecke einsetzen zu können. Da gegen das pGvpE kein Antiserum vorhanden ist, wurde außerdem geprüft, ob die beiden vorhandenen Antiseren

gegen cGvpE (aus c-vac-Region von *Hb. salinarum*) bzw. mcGvpE (aus mc-vac-Region von *Hf. mediterranei*) mit pGvpE reagieren.

Herstellung des P_A -gvpE-Konstrukts

Das Fusionskonstrukt wurde mittels rekombinanter PCR hergestellt und in den halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 inseriert. Die Richtigkeit der Fusion wurde mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft. Das Konstrukt wurde anschließend zur Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 verwendet. Für die folgenden Tests der c-GvpE und mcGvpE-Antiseren wurden auch Transformanten hergestellt, die den c-gvpE-, mc-gvpE- bzw. p-gvpE-Leserahmen unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors im Expressionsvektor pJAS35 exprimieren (Krüger *et al.*, 1998; Gregor & Pfeifer, 2001). Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse kontrolliert und mittels Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit geprüft. Durch Auftrennen von je 20 μ g der jeweiligen Proteinlysate über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde überprüft, ob in Form einer verstärkten Proteinbande das pGvpE-Protein bereits in einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel sichtbar war. Für die anschließende Western-Analyse, um die beiden Antiseren cGvpE und mcGvpE auf eine Reaktion mit pGvpE zu testen, wurden jeweils aus der stationären Wachstumsphase eine Probe entnommen und die cytoplasmatischen Proteine isoliert.

Überprüfen der Expression des P_A -gvpE-Gens mittels SDS-Polyacrylamidgel

Für die Analyse der Proteinlysate wurden aus der stationären Wachstumsphase einer P_A -gvpE und pE^{Ex} Kultur sowie von *Hf. volcanii* (Hv) als Kontrolle Proben entnommen und die Proteine isoliert. Nach dem Zellaufschluss wurden die Lysate über Nacht dialysiert und anschließend abzentrifugiert, um die Zelltrümmer von der cytoplasmatischen Fraktion zu trennen. Von der cytoplasmatischen Fraktion wurden je 20 μ g Gesamt-Protein über ein SDS-PAGE aufgetrennt. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE zeigte im Zelllysat der P_A -gvpE-Transformante in der Laufhöhe von ca. 55 kDa eine verstärkt sichtbare Proteinbande, die der Größe des pGvpE-Dimers entsprechen könnte (Abbildung 35). Im Zelllysat der pE^{Ex}-Transformante, sowie in dem Zelllysat von *Hf. volcanii* war diese Proteinbande nicht sichtbar. Eine weitere verstärkt sichtbare Proteinbande war in der Laufhöhe von ca. 30 kDa sichtbar, die der Laufgröße des pGvpE-Monomers im SDS-PAGE entsprechen könnte (Abbildung 35). Diese Proteinbande war in den beiden Transformanten pE^{Ex} und Hv ebenfalls nicht sichtbar und entspricht daher mit aller Wahrscheinlichkeit dem pGvpE.

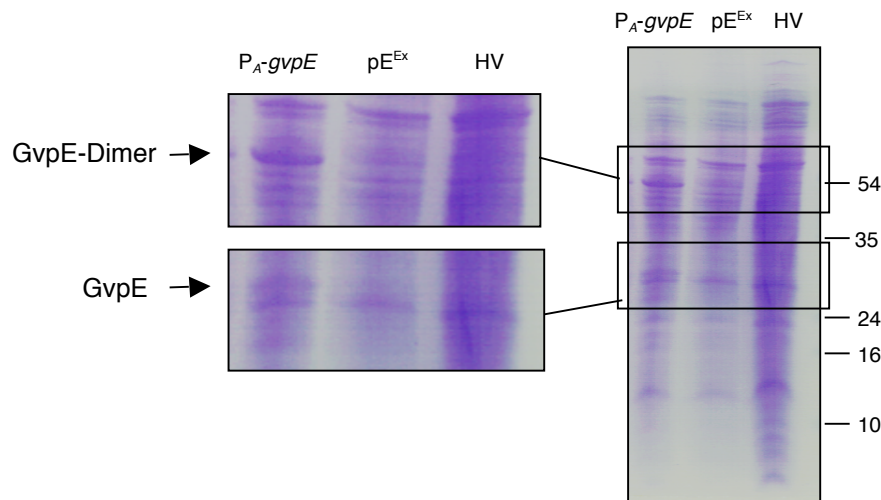


Abb.35 12%iges, Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit 20 µg lösliche Proteine aus der *P_A-gvpE*-, *pE^{Ex}*-Transformante, sowie *Haloferax volcanii* (Hv). Links ist ein vergrößerter Ausschnitt gezeigt, die Pfeile zeigen das GvpE-Dimer und das GvpE-Monomer. Rechts ist der Protein-Größenstandard in kDa angegeben.

Falls dieses Protein GvpE darstellte, zeigte diese Analyse, dass das pGvpE-Protein unter der Kontrolle des *P_A*-Promotors in großen Mengen gebildet wurde. Es zeigte sich allerdings auch, dass die Transformanten, die das *P_A-gvpE*-Fusionskonstrukt besitzen, schneller abstarben. Möglicherweise wirkte die starke Überproduktion des pGvpE-Proteins toxisch auf die Zellen. Durch ständiges überimpfen der Kulturen konnten die Transformanten aber am Leben erhalten werden. Ob die Menge an pGvpE-Protein ausreicht, um dieses proteinchemisch aufzureinigen zu können, werden erst die weiteren Reinigungsversuche zeigen.

Überprüfen der Expression des *P_A-gvpE*-Gens mittels Western-Analyse

Mit den Proben wurden Western-Analysen durchgeführt, dabei sollte geprüft werden, ob eines der beiden vorhandenen Antiseren gegen cGvpE und mcGvpE auch pGvpE detektierte und ob es sich bei den beiden Proteinbanden, die im SDS-Polyacrylamidgel verstärkt sichtbar waren, um pGvpE handelte. Für die Western-Analyse wurden erneut 20 µg Gesamt-Protein der *P_A-gvpE* und *pE^{Ex}* Probe sowie von einer Probe der *cE^{Ex}*- und *mcE^{Ex}*-Transformante als Kontrolle über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und eine Western-Analyse durchgeführt. Das cGvpE-Antiserum detektierte pGvpE (Abbildung 36A), mit mcGvpE fand keine Reaktion statt. Mit dem mcGvpE-Antiserum konnte pGvpE ebenfalls detektiert werden, während mit cGvpE fand keine Reaktion statt (Abbildung 36B). Das Signal für pGvpE, das mit dem Antiserum gegen cGvpE erhalten wurde, war stärker als das Signal mit mcGvpE,

demnach lässt sich das pGvpE-Protein mit dem cGvpE-Antiserum besser detektieren als mit dem mcGvpE-Antiserum.

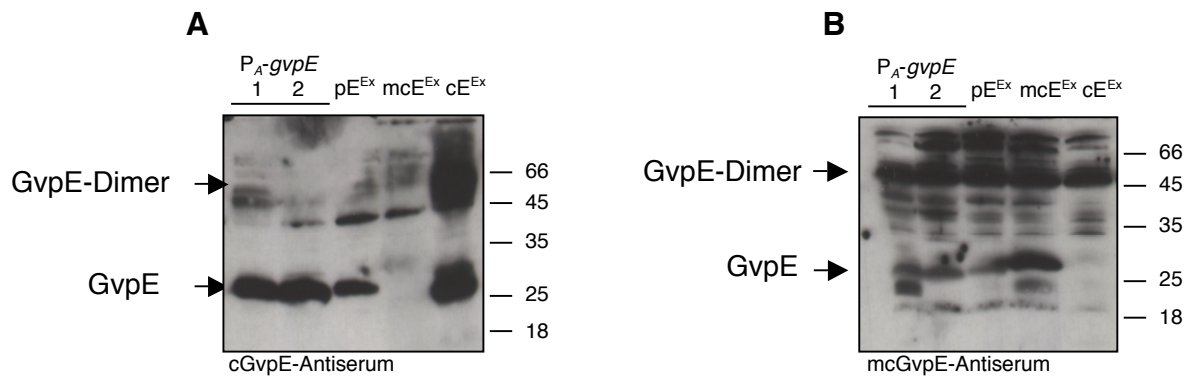


Abb. 36 Western-Analyse zum Nachweis des GvpE-Proteins Die Detektion erfolgte mit dem (A) cGvpE-spezifischen Antiserum und (B) mit dem mcGvpE-spezifischen Antiserum. Es wurden jeweils 20 μ g lösliches Gesamtprotein aus der stationären Wachstumsphase der P_A -gvpE-, pE^{Ex}-, cE^{Ex}- und mcE^{Ex}-Transformante über ein 16%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Pfeil jeweils links zeigt jeweils das detektierte GvpE-Protein, der Proteingrößenstandard ist jeweils rechts in kDa angegeben.

Das Signal für das pGvpE-Protein, das unter Kontrolle des P_A -Promotors exprimiert wurde, war deutlich stärker als das Signal des pGvpE-Proteins, dessen Gen unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors exprimiert wurde. Die Western-Analyse zeigte, dass das pGvpE-Protein unter der Kontrolle des P_A -Promotors in großen Mengen gebildet wurde. Das GvpE-Protein wurde in einer Laufhöhe von 30 kDa detektiert. Demnach handelt es sich bei der im SDS-Polyacrylamidgel verstärkt sichtbaren Proteinbande tatsächlich um pGvpE.

Diskussion

Alle 14 an der Gasvesikelsynthese beteiligten Gene aus *Hb. salinarum* PHH1 besitzen mit Ausnahme von *p-gvpA* und *p-gvpO* stromaufwärts des Startcodons eine purinreiche Sequenz, die direkt komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA ist. Die SD-Sequenz der Gene *p-gvpE*, *p-gvpF*, *p-gvpH* und *p-gvpJ* stimmen mit 6 bis 8 nt mit der komplementären Sequenz GGAGGUGA der 16S rRNA überein. Damit besitzen 33,3% der *gvp*-Gene eine gut konservierte SD-Sequenz. Bioinformatische Analysen von 1755 Genen aus *Halobacterium salinarum* sp. NRC-1 zeigen nur bei 26,6% eine gut konservierte SD-Sequenz (Ma *et al.*, 2002). Die SD-Sequenz dient nicht nur als Erkennungssequenz für die kleine ribosomale Untereinheit, sondern sie bringt auch das Startcodon in die Nähe der Initiator-tRNA, die in der P-Bindestelle gebunden vorliegt (Bell & Jackson, 1998; Kozak, 1999). Um dies zu ermöglichen, ist ein definierter Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz notwendig. Für Bakterien beträgt der optimale Abstand der SD-Sequenz zum Startcodon 5 bis maximal 13 nt, wobei bei *E. coli* der optimale Abstand zwischen 8 und 10 nt liegt (Chen *et al.*, 1994). Bioinformatische Studien zeigen, dass bei *Halobacterium* sp. NRC-1 der Abstand zwischen dem GGAGG-Zentrum und dem Startcodon meist 9 bis 11 nt beträgt (Ma *et al.*, 2002). Untersuchungen der SD-Sequenzen bakterieller Gene zeigt, dass die SD-Sequenz zwar ein wichtiges Erkennungssignal für eine effiziente Translation darstellt, aber nicht essentiell ist (Calogero *et al.*, 1988). *In vitro* Untersuchungen mit Genen aus *Sulfolobus solfataricus* zeigen, dass zwei Punktmutation in der SD-Sequenz von GAGGUGA nach GACGUCA bereits zu einem vollständigen Verlust der Translation führen (Condó *et al.*, 1999). Die Funktion der SD-Sequenz des *p-gvpG*-Gens wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit mittels Western-Analysen untersucht (Sartorius-Neef, 2000). Dabei zeigte sich, dass die durch Punktmutationen veränderte SD-Sequenz von GGAGG nach GGACG zu weniger GvpG-Protein führte. Dies lieferte somit erste Hinweise darauf, dass die SD-Sequenz auch bei Archaea wichtig für eine effiziente Translation ist.

Untersuchungen zur Funktion der SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens

Um die Bedeutung möglicher SD-Sequenzen auf die Initiation der Translation zu analysieren, wurde in dieser Arbeit die SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens näher untersucht. Die SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens stimmt mit 7 nt mit der Consensussequenz überein und befindet sich 7 nt stromaufwärts des AUG-Startcodons. Für die Analysen der Translation wurde das GvpH-Protein und auch das für eine β -Galaktosidase kodierende *bgaH*-Gen als Reporter verwendet. Die zunächst durchgeführte Western-Analyse mit einem gegen GvpH gerichteten

Antiserum zeigte, dass eine vollständig mutierte SD-Sequenz von GGAGGUCA nach CCUAAAAC dazu führte, dass weniger GvpH-Protein gebildet wurde, als wenn die SD-Sequenz unverändert war. Die Northern-Analyse mit einer gegen die *gvpH*-mRNA gerichteten RNA-Sonde zeigte, dass das *gvpH*-Transkript bei der Mutante mit der veränderten SD-Sequenz in ähnlicher Menge vorhanden war, wie bei der Mutante, die die SD-Sequenz in unveränderter Form enthielt. Daraus folgte, dass die reduzierte GvpH-Proteinmenge direkt auf eine veränderte Translationseffizienz zurückzuführen war. Bei den *in vitro* Studien mit SD-Sequenzen von *S. solfataricus* führten bereits zwei Punktmutationen innerhalb der SD-Sequenz zum vollständigen Verlust der Translation (Condó *et al.*, 1999). Demnach wird die Translation von Halobakterien *in vivo* nicht so sehr durch den Verlust der SD-Sequenz beeinflusst, wie in dem *in vitro*-System bei *Sulfolobus*.

Um den Einfluss der möglichen SD-Sequenz auf die Initiation der Translation besser zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit der Leserahmen des *bgaH*-Gens aus *Hf. lucentense* verwendet, der für eine halobakterielle β -Galaktosidase kodiert. Die durchgeführte *scanning*-Mutagenese eines 43 nt langen 5'-UTR des *gvpH*-Gens zeigte deutlich, dass die SD-Sequenz GGAGGUCA eine wichtige Funktion für die Initiation der Translation hat. Die zunächst durchgeführten Northern-Analysen zeigten, dass alle Transformanten ähnliche *bgaH*-Transkriptmengen bildeten, wie die Transformante, die das Konstrukt mit dem unveränderten 5'-UTR enthielt. Dies bedeutet, dass die eingeführten Mutationen im 5'-UTR keinen Einfluss auf die Transkriptmenge haben. Demnach ist eine veränderte β -Galaktosidase-Aktivität direkt auf eine veränderte Translationsrate zurück zu führen. Mutationen direkt stromaufwärts (SD0-Transformanten) und stromabwärts (SD5-Transformanten) zur 16S rRNA komplementären Sequenz zeigten keine signifikanten Veränderungen der β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber dem WT. Die eingeführten Mutationen in der 5'-GGAGGU-Region der SD-Sequenz (SD1-, SD2- und SD3-Transformanten) führten dagegen zu einer starken Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität (5-20%); auch im 3'-Bereich des SD-Elements führten Mutationen (SD4-Transformanten) noch zu einer Reduktion auf 25-50%. Der 3'-Bereich der SD-Sequenz schien demnach die Translation weniger stark zu beeinflussen als der 5'-Bereich der SD-Sequenz. Der Verlust der β -Galaktosidase-Aktivität der SD4-5 Transformante, die eine veränderte SD-Sequenz von GGAGGUCA nach GGAGAGGC enthielt, lag möglicherweise daran, dass durch die eingeführte Mutation eine neue SD-Sequenz geschaffen wurde. Der Abstand der neuen SD-Sequenz zum Startcodon betrug nur 2 nt, dieser Abstand schien allerdings zu kurz, wodurch letztlich die Translation dieser mRNA verhindert wurde. Die Ergebnisse zeigten auch, dass das GGAGG Motiv das Kernmotiv der SD-Sequenz darstellt, das für eine effiziente Translation notwendig ist. Dies stimmte gut mit den bioinformatischen Studien verschiedener

bakterieller und archaealer Genome überein, die zeigen, dass GGAGG häufig das Kernmotiv der SD-Sequenz darstellt (Ma *et al.*, 2002).

Eine SD-Sequenz, die zu 100% komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA war (SD8-Transformante), zeigte keinen weiteren signifikanten Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum WT. Interessanterweise führte eine vollständige Mutation der SD-Sequenz von GGAGGUCA nach CCUAAAAC in der SD7-Transformante nicht zum Verlust der β -Galaktosidase-Aktivität, sondern lediglich zu einer auf 20% reduzierten Aktivität im Vergleich zum WT. Diese Analyse lieferte somit ähnliche Ergebnisse, wie die zuvor durchgeführten Western-Analysen mit dem GvpH-Protein als Reporter und zeigte, dass in Halobakterien auch mRNAs ohne SD-Element translatiert werden.

Die hier durchgeführten *in vivo*-Analysen zur Funktion einer möglichen SD-Sequenz bei der Initiation der Translation in einem halophilen Archaeon zeigten deutlich, dass die Translation verringert war, wenn die SD-Sequenz mutiert war und dass eine vollständige Mutation der SD-Sequenz nicht zum Verlust, sondern zu einer geringeren Translationsrate *in vivo* führte. Dadurch wurde gezeigt, dass die SD-Sequenz zwar für die Translation eine wichtige Funktion hat, aber nicht zwingend erforderlich war. Die Ergebnisse stimmen gut mit Untersuchungen zur Funktion von SD-Sequenzen in Bakterien überein, auch hier zeigte sich, dass die SD-Sequenz nicht essentiell für die Initiation der Translation ist, aber ein wichtiges Signal für eine effiziente Translation darstellt (Calogero *et al.*, 1988). Im Gegensatz dazu wurde in einem *in vitro*-System von bei *S. solfataricus* gezeigt, dass die SD-Sequenz hier zwingend für eine Translation erforderlich ist und Gene ohne SD-Sequenz im 5'-UTR nicht translatiert werden können (Condó *et al.*, 1999).

Bestimmung des optimalen Abstandes zwischen SD-Sequenz und Startcodon

Damit das Startcodon mit der Initiator t-RNA wechselwirken kann, ist ein definierter Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon notwendig. Der Abstand der SD-Sequenz relativ zum Startcodon liegt bei den p-*gvp*-Genen aus *Hb. salinarum* PHH1 in vier Fällen zwischen 3 und 4 nt (*gvpD*, *gvpC*, *gvpN* und *gvpM*), ein Abstand von 5 nt findet man bei *gvpF*. Bei den restlichen *gvp*-Genen (*gvpEGHIJKL*) liegt die SD-Sequenz in einem Abstand von 6 oder 7 nt relativ zum Startcodon.

Um den optimalen Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit der Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon des p-*gvpH*-Gens durch Insertionen bzw. Deletion verlängert bzw. verkürzt. Um den Einfluss des Abstandes der SD-Sequenz zum Startcodon auf die Initiation der Translation besser zu quantifizieren, wurde der Leserahmen des *bgaH*-Gens als Reporter verwendet.

Die SD-Sequenz des *p-gvpH*-Gens liegt 7 nt stromaufwärts des Startcodons. Die β -Galaktosidase-Aktivität der Transformanten lag in der gleichen Größenordnung wie die des WT, wenn der Abstand 4 bzw. 10 nt betrug (H4- und H10-Transformante). Wurde dagegen der Abstand auf nur 1 nt zwischen Startcodon und SD-Sequenz (H1-Transformante) verkürzt, konnte keine β -Galaktosidase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität auf 10% im Vergleich zum WT zeigte die H5-Transformante, obwohl ein Abstand von 5 nt ausreichen sollte, um die Translation zu initiieren. Ob in dieser Mutante möglicherweise die Bildung einer Haarnadel-Struktur im 5'-UTR die Translation verhindert, konnte mittels einer Analyse der mRNA-Sekundärstruktur durch das RNA-Faltungsprogramm „Mfold“ nicht bestätigt werden. Die durchgeführte Northern-Analyse zeigte, dass die Transkriptmenge der *bgaH*-mRNA der H5-Transformante und der H-*bgaH*-Transformante identisch war. Demnach ist auch die mRNA-Stabilität nicht für die verringerte BgaH-Menge verantwortlich. Die *scanning*-Mutagenese des 5'-UTR des *gvpH*-Gens zeigte bereits, dass das Fehlen des SD-Elements (SD7-Transformante) zu einer Reduktion der spezifischen BgaH-Aktivität auf 20% führte. Bei der H5-Transformante war die spezifische BgaH-Aktivität sogar auf 10% der Ausgangsaktivität reduziert. Die Ursachen für die reduzierte Translation konnte bisher nicht geklärt werden.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass der Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz zwischen 4 und 10 nt liegen kann. Dieses Ergebnis stimmte gut überein mit dem Abstand des GGAGG-Zentrums, der zwischen 9 und 11 nt stromaufwärts vom Startcodon liegt und bioinformatisch für die SD-Sequenzen von *Hb. salinarum* sp. NRC-1 bestimmt wurde (Ma *et al.*, 2002). Ebenso gut stimmt dieses Ergebnis mit den Daten für Bakterien überein, wo der Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz mindestens 5 nt und maximal 13 nt betragen kann, wobei bei *E. coli* der Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon meist zwischen 8 und 10 nt liegt (Chen *et al.*, 1994).

Untersuchungen eines mRNA-leaders ohne SD-Sequenz

Bioinformatische Analysen bereits vollständig sequenzierter archaealer Genome zeigen, dass SD-Sequenzen meist vor Genen gefunden werden, die innerhalb eines Operons liegen, meist aber fehlt eine SD-Sequenz vor dem ersten Gen eines Operons oder bei einzeln transkribierten Genen (Tolstrup *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2002)). *In vitro* Untersuchungen bei *Sulfolobus* zeigen, dass mRNAs, die in ihrem mRNA-leader keine SD-Sequenz besitzen, nicht translatiert werden können, da die 30S ribosomale Untereinheit keinen stabilen Komplex mit der mRNA bilden kann (Condó *et al.*, 1999; Benelli *et al.*, 2003). Der *p-gvpA*-

mRNA-*leader* aus *Hb. salinarum* ist 20 nt lang und besitzt keine Sequenz, die einer SD-Sequenz ähnelt. Am 5'-Ende der mRNA befindet sich eine kleine stem-loop-Struktur, die möglicherweise an der RNA-Stabilität beteiligt ist. Bei Bakterien wie z.B. *E. coli* und *R. capsulatus* konnte gezeigt werden, dass RNase E und das Degradosom einzelsträngige RNAs am 5'-Ende der mRNA erkennen können und die mRNA von 5'→3' degradieren. Stem-loop-Strukturen am 5'-Ende können vor einer Degradation schützen und die mRNA stabilisieren (Mackie, 1998; Rauhut & Klug, 1999). Die Initiation der Translation der p-*gvpA*-mRNA kann nicht durch mRNA-rRNA-Wechselwirkung initiiert werden, dennoch wird das p-*gvpA*-Gen, das für das Hauptstrukturprotein der Gasvesikel kodiert und sowohl monocistronisch als auch polycistronisch als *gvpACNO* transkribiert wird, sehr effizient translatiert (Offner *et al.*, 1996). Untersuchungen des mRNA-*leaders* des *tuf*-Gens aus *Mycoplasma genitalis*, der keine SD-Sequenz besitzt, zeigen, dass der mRNA-*leader* eine 10 nt lange Sequenz beinhaltet, die komplementär zu einem Teil der 16S rRNA ist. Über diese Sequenz erkennt die kleine ribosomale Untereinheit die mRNA durch mRNA-rRNA-Wechselwirkung, vergleichbar der Initiation über die SD-Sequenz (Loechel *et al.*, 1991).

Um zu prüfen, ob bestimmte Sequenzbereiche im p-*gvpA*-mRNA-*leader* für die Initiation der Translation von Bedeutung sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *scanning*-Mutagenese durchgeführt. Zur quantitativen Analyse wurde die P_A -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart und die jeweiligen mRNA-*leader* an den *bgaH*-Leserahmen fusioniert, der für eine halobakterielle β -Galaktosidase kodiert und als Reporter verwendet wurde.

Bei zwei der Mutanten (B4 und E3) wurde ein neues Startcodon erzeugt, das außerhalb des Leserahmens zum eigentlichen Startcodon lag. Aus diesem Grund wurde kaum BgaH-Enzym gebildet, die β -Galaktosidase-Aktivität dieser beiden Transformanten war auf <10% reduziert im Vergleich zur Ausgangsaktivität des WT. Eine Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität wurde bei den Mutanten mTL-A2, mTL-A3 und mTL-B3 gemessen, die eine veränderte Sequenz in der Nähe des 5'-Ende der mRNA hatten, wodurch die hier vorhandene mRNA-Sekundärstruktur nicht mehr ausgebildet werden konnte. Die Transformanten mTL-A1 und mTL-B1 mit Mutationen in der gleichen Region zeigten dagegen keine reduzierte β -Galaktosidase-Aktivität. Bei der Transformante mTL-B2 war die β -Galaktosidase-Aktivität sogar erhöht im Vergleich zum WT. Demnach hat die stem-loop-Struktur am 5'-Ende der mRNA für die Initiation der Translation keine Bedeutung. Auch für die mRNA-Stabilität schien durch die stem-loop-Struktur am 5'-Ende der mRNA nicht beeinflusst zu werden, da Northern-Analysen zeigten, dass alle Transformanten die *bgaH*-mRNA in der gleichen Menge bildeten. Bei den restlichen Mutanten lag die β -Galaktosidase-

Aktivität annähernd in der gleichen Größenordnung wie die des WT, außer bei der mTL-D4 Mutante, für die sogar eine 3fach erhöhte β -Galaktosidase Aktivität gemessen wurde.

Durch die *scanning*-Mutagenese konnte keine eindeutige Sequenz im p-*gvpA*-mRNA-*leader* bestimmt werden, die die Initiation der Translation begünstigt oder deren Verlust die Initiation stark beeinträchtigt. Auch konnte nicht gezeigt werden, dass die mRNA-Stabilität von der Sequenz und/oder der Struktur des mRNA-*leaders* abhängt.

Untersuchungen eines verkürzten p-*gvpA*-mRNA-*leaders*

Möglicherweise ist die Länge des mRNA-*leaders* ein wichtiges Kriterium für die Initiation der Translation und/oder der mRNA-Stabilität. Bereits früher durchgeführte Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass eine Deletion von 6 nt im p-*gvpA*-mRNA-*leader*, wodurch der *leader* sich von 20 auf 14 nt verkürzt und die Ausbildung der Sekundärstruktur am 5'-Ende der mRNA verhindert wird, die Genexpression nicht beeinflusst (Δ TL-*gvpA*-Transformante) (Sartorius-Neef, 2000). Für die damaligen Untersuchungen wurde das GvpA-Protein als Reporter verwendet. Um den Einfluss der Länge des mRNA-*leaders* nochmals genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Transformanten verwendet, die zusätzlich den p-*gvpE*-Leserahmen im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 enthielten, da der P_A -Promotor durch GvpE aktiviert wird (Gregor & Pfeifer, 2001),

In der Northern-Analyse wurde die *gvpA*-mRNA der pA-*gvpA*- und Δ TL-*gvpA*-Transformante annähernd in der gleichen Menge detektiert. Demnach wird die mRNA-Stabilität durch eine Verkürzung des mRNA-*leaders* um 6 nt nicht verändert. Die Western-Analyse zeigte, dass die Δ TL-*gvpA*-Transformante, die zusätzlich p-*gvpE* exprimiert, deutlich mehr GvpA-Protein bildete, als die pA-*gvpA*-Transformante, die den mRNA-*leader* in seiner ursprünglichen Länge enthält und ebenfalls p-*gvpE* exprimiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass eine Verkürzung des mRNA-*leaders* zu mehr GvpA-Protein führte.

Um den Einfluss der Länge des mRNA-*leaders* auf die Initiation der Translation zu quantifizieren, wurde der *bgaH*-Leserahmen verwendet. Die *bgaH*-mRNA in der Δ TL_A-*bgaH*-Transformante wurde in der gleichen Menge detektiert, wie in der A-*bgaH*-Transformante. Die gemessene spezifische Aktivität der Δ TL_A-*bgaH*-Transformante lag basal bei 38 mU/mg, das entspricht einer 40fachen Erhöhung der BgaH-Aktivität im Vergleich zum WT. Wurde zusätzlich p-*gvpE* exprimiert, lag die β -Galaktosidase-Aktivität bei 547 mU/mg. Im Vergleich zum WT entspricht dies einer 5fachen Erhöhung der BgaH-Aktivität. Damit lieferte die durchgeführte Analyse ein ähnliches Ergebnis, wie die zuvor durchgeführten Untersuchungen mit dem GvpA-Protein als Reporter, nämlich dass die Transkriptmenge

durch eine Verkürzung des *p-gvpA*-mRNA-*leaders* nicht beeinflusst wurde, aber die gleiche Menge der mRNA zu mehr Produkt führte, demnach wurde die mRNA mit dem verkürzten mRNA-*leader* besser translatiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Verkürzung des *p-gvpA*-mRNA-*leaders* zu einer gesteigerten Translationsrate führt. Für die mRNA-Stabilität scheint die Länge des mRNA-*leaders* weniger wichtig zu sein. Dies lieferte erste Hinweise darauf, dass der *p-gvpA*-mRNA-*leader* möglicherweise an der negativen Regulierung der Translation beteiligt sein könnte.

Untersuchungen zur Initiation der Translation von *leader*-losen mRNAs

Einem sehr großen Anteil archaealer Transkripte fehlt ein mRNA-*leader* und dennoch werden diese sehr effizient translatiert. Solche *leader*-losen mRNAs findet man in allen drei Domänen des Lebens, wobei der Anteil *leader*-loser mRNAs in Archaea am höchsten ist (Sensen *et al.*, 1996; Slupska *et al.*, 2001). Unabhängig von welchem Organismus sie stammen, werden *leader*-lose mRNAs sowohl von bakteriellen, archaealen als auch eukaryontischen Ribosomen erkannt. Die Initiation der Translation *leader*-loser mRNAs kann nicht durch mRNA-rRNA-Wechselwirkung erfolgen, man nimmt daher an, dass es noch mindestens einen weiteren Mechanismus geben muss, wie die Translation initiiert wird. (O'Connor *et al.*, 1999; La Taena *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2000 und 2001). Bei *E coli* konnte gezeigt werden, dass *leader*-lose mRNAs vom 70S Ribosom erkannt werden, das bereits den Komplex aus IF2 und Initiator-tRNA gebunden hat. Die Effizienz der Translation hängt davon ab, ob AUG als Startcodon vorhanden ist (Moll *et al.*, 2002 und 2004; O'Donnell & Janssen, 2002; Udagawa *et al.*, 2004). Untersuchungen einer *leader*-losen mRNAs von *Sulfolobus* zeigt, dass *leader*-lose mRNAs nur dann *in vitro* translatiert werden, wenn zusätzlich die Initiator-tRNA vorhanden ist, die Erkennung der mRNA erfolgt dann über Codon-Anticodon Wechselwirkung (Benelli *et al.*, 2003).

Um zu prüfen, ob der mRNA-*leader* die Effizienz der Translation beeinflusst, wurde der Einfluss des mRNA-*leaders* weiterer *p-vac*-Gene (*p-gvpA*, *p-gvpD* und *p-gvpF*) aus *Hb. salinarum* PHH1 auf die Translation näher untersucht. Neben dem *p-gvpA*-Gen, das ein 20 nt langen mRNA-*leader* besitzt, befindet sich vor dem *p-gvpD*-Gen ein 71 nt langer und vor dem *p-gvpF*-Gen ein 169 nt langer mRNA-*leader*. Der 169 nt lange *gvpF*-mRNA-*leader* bildet Sekundärstrukturen aus, die möglicherweise an der RNA-Stabilität beteiligt sind (Offner *et al.*, 1996). Untersuchungen, bei denen der *gvpF*-mRNA-*leader* durch den 21 nt langen mRNA-*leader* des *mc-gvpA*-Gens aus *Hf. mediterranei* ersetzt wurde, zeigen, dass der *gvpF*-

mRNA-*leader* möglicherweise die mRNA destabilisiert. So bildet eine Mutante, die die *gvpF*-mRNA mit dem *mc-gvpA-leader* unter der Kontrolle des P_F -Promotors transkribiert, mehr Transkript, als die Mutante, die den *gvpF*-mRNA-*leader* enthält (Hofacker, 2002). Der P_F -Promotor ist nur in der frühen exponentiellen Wachstumsphase aktiv, das *gvpFGHIJKLM* Transkript ist in der stationären Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar (Offner *et al.*, 1996).

Für die Untersuchungen wurde jeweils ein Konstrukt verwendet, das die P_A - P_D - bzw. P_F -Promotorregion und den jeweiligen mRNA-*leader* des *gvpA*, *gvpD* bzw. *gvpF*-Gens besaß und ein zweites, bei dem der jeweilige mRNA-*leader* deletiert war. Die Transkription erfolgte jeweils vom natürlichen Promotor aus. Außerdem wurde der 5'-UTR des *p-gvpH*-Gens deletiert, sodass daraus ebenfalls eine *leader*-lose mRNA resultierte (Δ lead-Transformante). Für die quantitativen Analysen wurde das *bgaH*-Gen verwendet. Für die Analysen der *pA-gvpA*- und Δ L-*gvpA*-Transformante wurde neben dem *bgaH*-Gen auch das GvpA-Protein als Reporter verwendet. Verglichen wurde immer das Konstrukt, das den mRNA-*leader* enthält mit dem Konstrukt, bei dem der mRNA-*leader* vollständig entfernt wurde.

Die zunächst durchgeführte Western-Analyse der *pA-gvpA*- und Δ L-*gvpA*-Transformante, die zusätzlich *p-gvpE* exprimierten zeigte, dass die Transformante mit dem *leader*-losen Konstrukt (Δ L-*gvpA*-Transformante) um ein vielfaches mehr GvpA-Protein bildete, als die *pA-gvpA*-Transformante, die das Konstrukt mit dem mRNA-*leader* enthielt. In der Northern-Analyse wurde die *gvpA*-mRNA in beiden Transformanten in der gleichen Menge detektiert. Die mRNA-Stabilität schien demnach durch den mRNA-*leader* nicht verändert worden zu sein. Das Ergebnis zeigte, dass die *leader*-lose mRNA deutlich besser translatiert wurde, als die mRNA mit dem *leader*-Bereich.

Die Untersuchungen mit dem *bgaH*-Gen als Reporter erbrachten ähnliche Ergebnisse. Hier wurde das *leader*-lose Transkript der Δ L_A-*bgaH*-Transformante 100fach stärker translatiert im Vergleich zur *A-bgaH*-Transformante. Bei der Δ L_A-*bgaH*/pE^{Ex}-Transformante, die zusätzlich *p-gvpE* exprimierte, war die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität 15fach erhöht im Vergleich zur *A-bgaH*/pE^{Ex}-Transformante. Die Transkriptmenge war bei der *A-bgaH*- und Δ L_A-*bgaH*-Transformante identisch. Auch die beiden Transformanten *A-bgaH*/pE^{Ex} und Δ L_A-*bgaH*/pE^{Ex} unterschieden sich nicht in der gebildeten *bgaH*-Transkriptmenge. Die Analyse mit dem *bgaH*-Gen als Reporter lieferte somit ähnliche Ergebnisse wie die zuvor durchgeführten Untersuchungen mit dem GvpA-Protein als Reporter. Die *leader*-lose mRNA wurde viel stärker translatiert als die mRNA, die den *p-gvpA*-mRNA-*leader* enthielt, die mRNA-Stabilität schien durch die Deletion des mRNA-*leaders* nicht verändert worden zu sein.

Es wurde weiterhin untersucht, ob eine *leader*-lose mRNA von *gvpD* und *gvpF* ebenfalls stärker translatiert wurde als die mRNA, die den entsprechenden *leader*-Bereich enthielt. Die Konstrukte wurden jeweils so mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert, dass die BgaH am N-Terminus die ersten 6 Aminosäuren (MAQPDS) des p-*gvpA*-Gens enthielt, um ein identisches Produkt zu erzeugen. Es ist bereits bekannt, dass eine Fusion der ersten 6 Codons des p-*gvpA*-Leserahmens mit dem *bgaH*-Leserahmen die Translation nicht beeinflusst (Gregor & Pfeifer, 2001). Für die D-*bgaH*-Transformante, die das Konstrukt mit dem *gvpD*-mRNA-*leader* enthielt, war keine β -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar ebenso für die F-*bgaH*-Transformante, die den *gvpF*-mRNA-*leader* enthielt. Für die Δ_{L_D} -*bgaH*- und Δ_{L_F} -*bgaH*-Transformante konnte jedoch eine geringe BgaH-Aktivität nachgewiesen werden. Die Northern-Analyse zeigte, dass die D-*bgaH*-, und Δ_{L_D} -*bgaH*-Transformante die *bgaH*-mRNA in der gleichen Menge bildeten. Für das *leader*-lose Konstrukt (Δ_{L_D} -*bgaH*-Transformante) lag die β -Galaktosidase-Aktivität bei nur 1,3 mU/mg und somit an der Nachweisgrenze. Eine β -Galaktosidase-Aktivität von < 0,5 mU/mg kann mit dem ONPG-Test nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigte, dass auch hier das *leader*-lose *gvpD*-Konstrukt im Vergleich zu dem *leader*-haltigen *gvpD*-Konstrukt besser translatiert wurde. Für die F-*bgaH*-Transformante wurde ebenfalls keine, für die Δ_{L_F} -*bgaH*-Transformante dagegen geringe β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen. Die Northern-Analyse zeigte, dass die F-*bgaH*-Transformante im Vergleich zur Δ_{L_F} -*bgaH*-Transformante weniger *bgaH*-Transkript bildete, demnach schien der mRNA-*leader* die Stabilität der *gvpF*-mRNA negativ zu beeinflussen. Das Ergebnis bekräftigte die Beobachtungen früherer Studien, dass der mRNA-*leader* des p-*gvpF*-Gens an der mRNA-Stabilität beteiligt ist (Offner *et al.*, 1996; Hofacker, 2002).

Die vollständige Deletion des 5'-UTR des p-*gvpH*-Gens (Δ_{lead} -Transformante) führte zur Transkription einer *leader*-losen mRNA, die direkt mit dem A des Startcodons beginnt. Die β -Galaktosidase-Aktivität dieser Transformante war um das 15fache erhöht im Vergleich zur H-*bgaH*-Transformante, die den unveränderten 5'-UTR des p-*gvpH*-Gens enthielt. Um zu prüfen, ob die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität mit dem veränderten Enzym zusammenhing, dem die ersten 6 Aminosäuren des *gvpH*-Gens am N-Terminus fehlten, wurde das Δ_{SD} -Konstrukt verwendet. Allerdings wurde hier die *leader*-lose mRNA anscheinend nicht translatiert, da keine β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden konnte. Sekundärstruktur-Analysen mit dem RNA-Faltungsprogramm „Mfold“ zeigten, dass am 5'-Ende die Ausbildung eines stem-loops möglich ist, an dem auch das Startcodon beteiligt ist, wodurch letztlich die Translation verhindert worden sein könnte.

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass *leader*-lose mRNAs häufig stärker translatiert werden als *leader*-haltige mRNAs. Die Initiation der Translation kann nicht durch mRNA-rRNA-Wechselwirkung stattfinden, es muss demnach noch einen weiteren Mechanismus geben, wie *leader*-lose mRNAs translatiert werden. Die Untersuchungen lieferten weitere Hinweise dafür, dass der mRNA-*leader* an der Regulation der Translation beteiligt ist.

Vergleich der vier p-vac-Promotoren

Die Gene der p-vac-Region werden von insgesamt vier Promotoren aus transkribiert, die sich vor p-*gvpA*, p-*gvpD*, p-*gvpF* und p-*gvpO* befinden. Während p-*gvpA*, p-*gvpD* und p-*gvpF* einem mRNA-*leader* besitzen, startet die Transkription des p-*gvpO*-Gens 1 nt stromaufwärts des AUG-Startcodons, die daraus resultierende mRNA besitzt somit keinen mRNA-*leader* (Offner *et al.*, 1996). Die vier p-vac-Promotoren wurden bereits von A. Hofacker in ihrer Dissertation untersucht, dabei zeigte sich, dass der P_A-Promotor der stärkste der vier Promotoren ist (Hofacker, 2002, Hofacker *et al.*, 2004). Für die damaligen Analysen wurde die Konstrukte pA, pD, pF und pO allerdings so hergestellt, dass jeweils die Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, der mRNA-*leader* und die ersten 5 Aminosäuren des jeweiligen *gvpA*-, *gvpD*-, *gvpF*- bzw. *gvpO*-Gens an den *bgaH*-Leserahmen fusioniert wurden. Die daraus resultierenden mRNAs unterscheiden sich somit nicht nur durch ihren Promotor von dem aus sie transkribiert wurden, sondern auch im mRNA-*leader* und die BgaH durch die unterschiedlichen 5 Aminosäuren am N-Terminus. Ein direkter Vergleich der Promotorstärken ist aber nur dann möglich, wenn die von den jeweiligen Promotoren aus transkribierte mRNA und auch die gebildete BgaH identisch sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die vier p-vac-Promotoren erneut verglichen. Dazu wurden die *leader*-losen Konstrukte ΔL_A -*bgaH*, ΔL_F -*bgaH* und ΔL_D -*bgaH*, die jeweils *leader*-lose mRNA bilden verwendet. Für die Untersuchungen des P_O-Promotors wurde das O-*bgaH*-Konstrukt verwendet, bei dem die P_O-Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, die ersten 6 Aminosäuren des p-*gvpA*-Leserahmens an den *bgaH*-Leserahmen fusioniert wurde. Somit sind die mRNAs, unabhängig von welchem Promotor aus sie transkribiert werden und somit auch die BgaH identisch. Unterschiedliche BgaH-Aktivitäten konnten somit direkt auf unterschiedliche Produktmengen zurückgeführt werden, d.h. auf die mRNA-Transkriptmenge, die vom jeweiligen Promotor aus gebildet wurde. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten, die das *leader*-lose Konstrukt enthielten, wurde anschließend mit der BgaH-Aktivität der bereits von A. Hofacker untersuchten Transformanten verglichen (Tabelle 6).

Tab. 6 Vergleich der spezifischen Aktivitäten der *Hf. volcanii* Transformanten, die das *leader*-lose ΔL_A -*bgaH*, ΔL_D -*bgaH*, ΔL_F -*bgaH* und *O-bgaH*-Konstrukt mit den bereits gemessenen spezifischen Aktivitäten von A. Hofacker.

Sartorius-Neef, diese Arbeit			Hofacker <i>et al.</i> , 2004	
Konstrukt	spez. Aktivität [mU/mg]		Konstrukt	spez. Aktivität [mU/mg]
	+ mRNA <i>leader</i>	<i>leaderlos</i>		
<i>A-bgaH</i> und ΔL_A - <i>bgaH</i>	1,0 ± 0,3	104 ± 40	pA	21,4 ± 7,4
<i>D-bgaH</i> und ΔL_D - <i>bgaH</i>	n.m.	1,3 ± 0,5	pD	1,0 ± 0
<i>F-bgaH</i> und ΔL_F - <i>bgaH</i>	n.m.	5,0 ± 1,6	pF	7,0 ± 0,3
<i>O-bgaH</i>	--	1,0 ± 0,4	pO	n.m.

* Die Konstrukte mit und ohne mRNA-*leader*, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden enthalten die ersten 18 nt des p-*gvpA*-Leserahmens. Die von A. Hofacker bereits untersuchten Konstrukte, enthalten jeweils die ersten 15 nt des p-*gvpD*, p-*gvpF* bzw. p-*gvpO*-Leserahmens. Die Konstrukte *A-bgaH* und pA sind identisch. Die Transformanten dieser Arbeit wurden in 3 M VM inkubiert, die von A. Hofacker in 3,5 M VM.

Der Vergleich der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivitäten der vier verschiedenen Promotoren ergab, dass der P_A -Promotor der stärkste der vier p-vac-Promotoren ist, gefolgt vom P_F , P_D und P_O -Promotor. Die ΔL_A -*bgaH*-Transformante bildete ausgehend vom P_A -Promotor die größten Mengen des *bgaH*-mRNA-Transkriptes und besaß die höchste β -Galaktosidase-Aktivität. Die Ergebnisse stimmen gut mit früheren Untersuchungen zur Promotorstärke der vier p-vac-Promotoren überein (Hofacker *et al.*, 2004). Während die β -Galaktosidase-Aktivitäten der ΔL_D -*bgaH*- und der pD-Transformante nahezu gleich waren, ebenso die BgaH-Aktivitäten der ΔL_F - und pF-Transformante, so lag die BgaH-Aktivität der ΔL_A -Transformante 5fach höher im Vergleich zu pA-Transformante. Demnach scheint die Translation durch den *gvpA*-mRNA-*leader* stärker beeinflusst zu werden als durch den *gvpD*- oder *gvpF*-mRNA-*leader*. Die beiden Konstrukte *A-bgaH* und pA sind identisch, die unterschiedlichen BgaH-Aktivitäten beruhen auf den unterschiedlichen salzabhängigen mRNA-Stabilitäten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Hf. volcanii*-Transformanten immer in 3 M NaCl-Medium kultiviert, während bei A. Hofacker die Transformanten in 3,5 M NaCl-Medium kultiviert wurden. Bereits für mc-*gvpA* ist gezeigt, dass die *gvpA*-mRNA-Halbwertszeit in *Hf. volcanii*-Transformanten, die in 18% NaCl-Medium kultiviert wurden bei 90 min liegt, während bei Kultivierung in 25% NaCl-Medium die Halbwertszeit der mc-*gvpA*-mRNA bei 160 min liegt (Jäger *et al.*, 2002).

Konstruktion eines Vektors zur Überexpression von p-*gvpE*

Auf den im Rahmen dieser Arbeit basierenden Ergebnissen, dass *leader*-lose mRNAs stets besser translatiert wurden, im Vergleich zu *leader*-haltigen mRNAs und der Kenntnisse früherer Untersuchungen, dass der P_A -Promotor durch GvpE stimuliert wird, wurde ein Vektor zur Überexpression von p-*gvpE* konstruiert, um genügend GvpE-Protein für die proteinchemische Reinigung und anschließende Kristallation zu erhalten. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit das P_A -*gvpE*-Konstrukt hergestellt, das die P_A -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart und daran fusioniert den p-*gvpE*-Leserahmen enthält. Eine Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigte eine verstärkte Proteinbande in der Höhe von 55 kDa und 30 kDa, die in Zelllysaten von *Hf. volcanii* und der pE^{Ex}-Transformante, die p-*gvpE* unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors exprimierte, nicht sichtbar waren. Die 30 kDa Proteinbande befanden sich genau auf der gleichen Laufrhöhe, in der auch mit dem cGvpE-Antiserum das pGvpE-Protein in der Western-Analyse detektiert wurde. Ob die Menge an pGvpE-Protein ausreicht, um dieses proteinchemisch aufzureinigen zu können, werden erst die weiteren Reinigungsversuche zeigen. Beobachtet wurde, dass die *Hf. volcanii*-Transformanten, die das P_A -*gvpE*-Konstrukt exprimierten recht schnell abstarben, möglicherweise wirkte sich die Überproduktion von GvpE toxisch auf die Zellen aus.

Fazit/Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SD-Sequenz des p-*gvpH*-Gens eine wichtige Funktion für eine effiziente Translation besitzt. Dabei ist die SD-Sequenz nicht zwingend erforderlich für die Initiation der Translation. Für die Initiation der Translation ist ein definierter Abstand zwischen Startcodon und SD-Sequenz notwendig, dieser wurde auf einen Bereich von 4 bis 10 nt bestimmt. Die untersuchten *leader*-losen mRNAs wurden stets stärker translatiert, als die Vergleichskonstrukte, die einen mRNA-*leader* besaßen. Die Funktion eines mRNA-*leaders* ohne SD-Sequenz im *leader*-Bereich im Zusammenhang mit der Initiation der Translation konnte nicht geklärt werden, es gibt aber Hinweise darauf, dass der mRNA-*leader* an der Regulation der Translation beteiligt ist und die mRNA-Stabilität beeinflusst.

Weitere Untersuchungen zur Initiation der Translation *leader*-loser mRNAs wären sicher interessant. Die bisher untersuchten *leader*-losen mRNAs stammten durchweg von Genen, die ursprünglich für *leader*-haltige mRNAs kodieren. Es wäre daher interessant, den Versuchansatz dieser Arbeit umzukehren und zu prüfen, ob die Fusion eines mRNA-*leaders* an eine ursprünglich *leader*-lose mRNA zu einer verminderten Translation führt. Dazu könnte man z.B. das *fdx*-Gen oder das *bop*-Gen verwenden, die beide als *leader*-lose mRNA

transkribiert werden und den *p-gvpA*-mRNA-*leader* vor diese mRNAs fusionieren. Fusioniert man an das Protein zusätzlich ein His-tag am C-terminus, könnte man mittels Western-Analysen prüfen, ob die *leader*-lose oder *leader*-haltige mRNA zu mehr Produkt führt.

Es wäre sicher auch reizvoll, das AUG-Startcodon durch alternative Startcodons auszutauschen und zu untersuchen, ob es zu Unterschieden in der Translationseffizienz kommt, wenn an der Stelle von AUG z.B. GUG oder UUG als Startcodon vorhanden ist.

Auch systematische Änderungen der Länge eines mRNA-*leaders* wären interessant, um zu analysieren, ob die Länge des mRNA-*leaders* die Initiation der Translation und/oder die mRNA-Stabilität beeinflusst. Es gibt sicherlich noch zahlreiche Möglichkeiten, die Funktion eines mRNA-*leaders* ohne SD-Sequenz wie der *p-gvpA*-mRNA-*leader* weiter zu untersuchen, um letztendlich die Funktion des mRNA-*leaders* bei der Initiation der Translation zu verstehen.

Ein besonders interessantes Ziel wäre die Konstruktion eines Überexpressionsvektors, der dann generell verwendet werden könnte, um halobakterielle Proteine homolog über zu produzieren. Ein Versuchsansatz hierfür könnte sein, dass man den Leserahmen, der für das gewünschte Protein kodiert, ohne mRNA-*leader* mit der P_A -Promotorregion fusioniert. Zusätzlich enthält der Vektor den *gvpE*-Leserahmen, im Idealfall unter der Kontrolle eines Promotors den man induzieren kann. Dadurch könnte man zu einem festgelegten Zeitpunkt die Expression von *gvpE* induzieren, wodurch wiederum der P_A -Promotor stimuliert und das gewünschte Protein in großer Menge produziert wird.

Literaturverzeichnis

- Andersen, J. & Delihas, N. (1990).** micF RNA binds to the 5' end of ompF mRNA and to a protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**, 9249-9256.
- Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M. & Delihas, N. (1989).** The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**, 17961-17970.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* **27**, 4658-4670.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1998).** Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Avron, M. (1986).** The osmotic components of halotolerant algae. *TIBS* **11**, 5-6.
- Babitzke, P. (1990).** micF RNA binds to the 5' end of ompF mRNA and to a protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**, 9249-9256.
- Babitzke, P. (1997).** Regulation of tryptophan biosynthesis: Trp-ing the TRAP or how *Bacillus subtilis* reinvented the wheel. *Mol Microbiol* **26**, 1-9.
- Banerjee, A. K. (1980).** 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev.* **44**, 175-205.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9188-9193.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* **6**, 222-228.
- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B. & Jackson, S. P. (1999).** Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13662-13667.
- Benelli, D., Maone, E. & Londei, P. (2003).** Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation. *Mol Microbiol* **50**, 635-643.
- Benne, R. & Hershey, J. W. (1978).** The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**, 3078-3087.
- Best, A. (2000).** Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Diplomarbeit, TU-Darmstadt.
- Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H. W. & Pfeifer, F. (1984).** Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression. *Nucleic Acids Res* **12**, 7949-7959.
- Blaurock, A. E. & Wober, W. (1976).** Structure of the wall of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J. Mol. Biol.* **106**, 872-888.
- Brinkman, A. B., Bell, S. D., Lebbink, R. J., de Vos, W. M. & van der Oost, J. (2002).** The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J Biol Chem.* **277**, 29537-29549.
- Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J. H., Thomm, M., de Vos, W. M. & van Der Oost, J. (2000).** An Lrp-like transcriptional regulator from the

archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* **275**, 38160-38169.

Brown, A. (1990). Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.

Busby, S. & Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**, 743-746.

Calogero, R. A., Pon, C. L., Canonaco, M. A. & Gualerzi, C. O. (1988). Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6427-6431.

Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. M., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Klausner, R. D. & Harford, J. B. (1988). Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* **240**, 924-928.

Chakrabarti, A. & Maitra, U. (1991). Function of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of an 80 S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J Biol Chem* **266**, 14039-14045.

Chaudhuri, J., Si, K. & Maitra, U. (1997). Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *J Biol Chem* **272**, 7883-7891.

Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res* **22**, 4953-4957.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

Clark, B., Grunberg-Manago, M., Gupta, N. K., Hershey, J., Hinnebusch, A. G., Jackson, R. J., Maitra, U., Mathews, M.B., , Merrick, W. C., Rhoads, R. E., Sonenberg, N., Spremulli, L. L., Trachsel, H. & Voorma, H. O. (1996). Prokaryotic and eukaryotic translation factors. *Biochimie (Paris)* **78**, 1119-1122.

Cline, S. W. & Doolittle, W. F. (1987). Efficient transfection of the archaebacterium *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **169**, 1341-1344.

Cline, S. W., Schalkwyk, L. C. & Doolittle, W. F. (1989). Transformation of the archaebacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J Bacteriol* **171**, 4987-4991.

Condo, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D. & Londei, P. (1999). Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **34**, 377-384.

Das, S., Maiti, T., Das, K. & Maitra, U. (1997). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2. *J Biol Chem* **272**, 31712-31718.

DasSarma, S., RajBhandary, U. L. & Khorana, H. G. (1984). Bacterio-opsin mRNA in wild-typ and bacterio-opsin deficient *Halobacterium halobium* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 125-129.

DasSarma, S., Arora, P., Lin, F., Molinari, E. & Yin, L. R. (1994). Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the gvp gene cluster of *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100. *J Bacteriol* **176**, 7646-7652.

Delihhas, N. (1995). Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol* **15**, 411-414.

DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5685-5689.

- Dennis, P. P. (1997).** Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.
- Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997).** Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 90-104.
- Dym, O., Mevarech, M. & Sussman, J. (1995).** Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science* **267**, 1344-1346.
- Eick, D., Wedel, A. & Heumann, H. (1994).** From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet* **10**, 292-296.
- Eisenberg, H. (1992).** Halophilic malate dehydrogenase--a case history of biophysical investigations: ultracentrifugation, light-, X-ray- and neutron scattering. *Biochem Soc Symp* **58**, 113-125.
- Englert, C. & Pfeifer, F. (1993).** Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *J Biol Chem* **268**, 9329-9336.
- Englert, C., Horne, M. & Pfeifer, F. (1990).** Expression of the major gas vesicle protein gene in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Mol Gen Genet* **222**, 225-232.
- Englert, C., Wanner, G. & Pfeifer, F. (1992b).** Functional analysis of the gas vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the gvpD gene or its product. *Mol Microbiol* **6**, 3543-3550.
- Englert, C., Kruger, K., Offner, S. & Pfeifer, F. (1992a).** Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. *J Mol Biol* **227**, 586-592.
- Enoru-Eta, J., Gigot, D., Thia-Toong, T. L., Glansdorff, N. & Charlier, D. (2000).** Purification and characterization of Sa-Irp, a DNA-binding protein from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* homologous to the bacterial global transcriptional regulator Lrp. *J Bacteriol* **182**, 3661-3672.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J. L., Mevarech, M. & Shoham, M. (1996).** Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* **3**, 452-458.
- Fuhrman, J. A., McCallum, K. & Davis, A. A. (1992).** Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *nature* **356**, 148-149.
- Grant, W. D. & Larsen, H. (1989).** Extremely halophilic archaeobacteria, order Halobacteriales ord. Nov., in Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, Ed., Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.3 Williams & Wilkins, Baltimore: 2216-2233.
- Gregor, D. (2002).** Untersuchungen zur Regulation von Promotoren aus halophilen Archaea mit dem bgaH-Reportergen. Dissertation, TU-Darmstadt.
- Gregor, D. & Pfeifer, F. (2001).** Use of a halobacterial bgaH reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* **147**, 1745-1754.
- Gregor, D. & Pfeifer, F. (2005).** In vivo analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. *Microbiology* **151**, 25-33.
- Grill, S., Gualerzi, C. O., Londei, P. & Blasi, U. (2000).** Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: evolutionary implications for translation. *Embo J* **19**, 4101-4110.
- Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1990).** Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.

- Gupta, R., Lanter, J. & Woese, C. R. (1983).** Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaebacterium. *Science* **221**, 656-659.
- Hain, J., Reiter, W. D., Hudepohl, U. & Zillig, W. (1992).** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* **20**, 5423-5428.
- Halladay, J. T., Jones, J. G., Lin, F., MacDonald, A. B. & DasSarma, S. (1993).** The rightward gas vesicle operon in *Halobacterium* plasmid pNRC100: identification of the gvpA and gvpC gene products by use of antibody probes and genetic analysis of the region downstream of gvpC. *J Bacteriol* **175**, 684-692.
- Harrell, C. M., McKenzie, A. R., Patino, M. M., Walden, W. E. & Theil, E. C. (1991).** Ferritin mRNA: interactions of iron regulatory element with translational regulator protein P-90 and the effect on base-paired flanking regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4166-4170.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C. & Thomm, M. (1996).** Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* **271**, 30144-30148.
- Hayes, P. K., Buchholz, B. & Walsby, A. E. (1992).** Gas vesicles are strengthened by the outer-surface protein, GvpC. *Arch Microbiol* **157**, 229-234.
- Hochheimer, A., Hedderich, R. & Thauer, R. K. (1999).** The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Mol Microbiol* **31**, 641-650.
- Hofacker, A. (2002).** Regulation der Gasvesikelbildung bei *Halobacterium salinarum* PHH1. Dissertation, TU-Darmstadt.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**, 1829-1838.
- Holmes, M. L. & Dyall-Smith, M. L. (2000).** Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Mol Microbiol* **36**, 114-122.
- Holmes, M. L., Nuttall, S. D. & Dyall-Smith, M. L. (1991).** Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on Haloferax DNA gyrase. *J Bacteriol* **173**, 3807-3813.
- Holmes, M. L., Scopes, R. K., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Englert, C., Pfeifer, F. & Dyall-Smith, M. L. (1997).** Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta* **1337**, 276-286.
- Horne, M. & Pfeifer, F. (1989).** Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and other related species. *Mol Gen Genet* **218**, 437-444.
- Horne, M., Englert, C. & Pfeifer, F. (1988).** Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol Gen Genet* **213**, 459-464.
- Horne, M., Englert, C., Wimmer, C. & Pfeifer, F. (1991).** A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaebacteria. *Mol Microbiol* **5**, 1159-1174.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.
- Hui, I. & Dennis, P. P. (1985).** Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in *Halobacterium cutirubrum*. *J Biol Chem* **260**, 899-906.
- Jäger, A., Samorski, R., Pfeifer, F. & Klug, G. (2002).** Individual gvp transcript segments in

Haloferax mediterranei exhibit varying half-lives, which are differentially affected by salt concentration and growth phase. *Nucleic Acids Res* **30**, 5436-5443.

Jones, J. G., Hackett, N. R., Halladay, J. T., Scothorn, D. J., Yang, C. F., Ng, W. L. & DasSarma, S. (1989). Analysis of insertion mutants reveals two new genes in the pNRC100 gas vesicle gene cluster of *Halobacterium halobium*. *Nucleic Acids Res* **17**, 7785-7793.

Jost, M. (1965). Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens*. *D. C. Arch. Microbiol.* **50**, 211-245.

Kamekura, M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**, 289-295.

Kashefi, K. & Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**, 934.

Kinsman, R., Walsby, A. E. & Hayes, P. K. (1995). GvpCs with reduced numbers of repeating sequence elements bind to and strengthen cyanobacterial gas vesicles. *Mol Microbiol* **17**, 147-154.

Konopka, A. E., Staley, J. T. & Lara, J. C. (1975). Gas vesicle assembly in *Microcycylus aquaticus*. *J Bacteriol* **122**, 1301-1309.

Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* **15**, 1109-1123.

Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**, 1-45.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.

Krantz, M. J. & Ballou, C. E. (1973). Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J Bacteriol* **114**, 1058-1067.

Kruger, K. & Pfeifer, F. (1996). Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarium* PHH4. *J Bacteriol* **178**, 4012-4019.

Kruger, K., Hermann, T., Armbruster, V. & Pfeifer, F. (1998). The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J Mol Biol* **279**, 761-771.

Kyrpides, N. C. & Ouzounis, C. A. (1999). Transcription in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8545-8550.

La Teana, A., Brandi, A., O'Connor, M., Freddi, S. & Pon, C. L. (2000). Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box. *Rna* **6**, 1393-1402.

Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D. & Ebright, R. H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev* **12**, 34-44.

Lam, W. L. & Doolittle, W. F. (1989). Shuttle vectors for the archaebacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5478-5482.

Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. & Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5768-5772.

Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**, 272-290.

Lanyi, J. K. & MacDonald, R. E. (1976). Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport

in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles. *Biochemistry* **15**, 4608-4614.

Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W. & Rafferty, J. B. (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Embo J* **20**, 990-997.

Loechel, S., Inamine, J. M. & Hu, P. C. (1991). A novel translation initiation region from *Mycoplasma genitalium* that functions in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **19**, 6905-6911.

Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Ma, J., Campbell, A. & Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *J Bacteriol* **184**, 5733-5745.

Mackie, G. A. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **15**, 720-723.

Madigan, M. T. & Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* **2**, 265-269.

Maitra, U., Stringer, E. A. & Chaudhuri, A. (1982). Initiation factors in protein biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **51**, 869-900.

Mankin, A. & Kagramanova, V. (1986). Complete nucleotide sequence of the single ribosomal RNA operon of *Halobacterium halobium*: secondary structure of the archaebacterial 23S rRNA. *Mol Gen Genet* **202**, 152-161.

Marquez, E. D. & Brodie, A. F. (1973). The effect of cations on the heat stability of a halophilic nitrate reductase. *Biochim Biophys Acta* **321**, 84-89.

Mayr, A. & Pfeifer, F. (1997). The characterization of the nv-gvpACNOFGH gene cluster involved in gas vesicle formation in *Natronobacterium vacuolatum*. *Arch Microbiol* **168**, 24-32.

McMaster, T. J., Miles, M. J. & Walsby, A. E. (1996). Direct observation of protein secondary structure in gas vesicles by atomic force microscopy. *Biophys J* **70**, 2432-2436.

Melancon, P., Leclerc, D., Destroismaisons, N. & Brakier-Gingras, L. (1990). The anti-Shine-Dalgarno region in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA is not essential for the correct selection of translational starts. *Biochemistry* **29**, 3402-3407.

Meury, J. & Kohiyama, M. (1989). ATP is required for K⁺ active transport in the archaebacterium *Haloferax volcanii*. *Arch Microbiol* **151**, 530-536.

Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C. O. & Blasi, U. (2002). Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Mol Microbiol* **43**, 239-246.

Moll, I., Hirokawa, G., Kiel, M., Kaji, A. & Blasi, U. (2004). Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3354-3363.

Moll, I., Huber, M., Grill, S., Sairafi, P., Mueller, F., Brimacombe, R., Londei, P. & Blasi, U. (2001). Evidence against an interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation. *J Bacteriol* **183**, 3499-3505.

Mwatha, W. E. & Grant, W. D. (1993). *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Lake Magadi, Kenya. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 401-404.

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F.,

- Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. & DasSarma, S. (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12176-12181.
- O'Connor, M., Asai, T., Squires, C. L. & Dahlberg, A. E. (1999).** Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8973-8978.
- O'Donnell, S. M. & Janssen, G. R. (2002).** Leaderless mRNAs bind 70S ribosomes more strongly than 30S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 6730-6733.
- Offner, S. & Pfeifer, F. (1995).** Complementation studies with the gas vesicle-encoding p-vac region of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal a regulatory role for the p-gvpDE genes. *Mol Microbiol* **16**, 9-19.
- Offner, S., Wanner, G. & Pfeifer, F. (1996).** Functional studies of the gvpACNO operon of *Halobacterium salinarum* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *J Bacteriol* **178**, 2071-2078.
- Offner, S., Hofacker, A., Wanner, G. & Pfeifer, F. (2000).** Eight of fourteen gvp genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *J Bacteriol* **182**, 4328-4336.
- Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., Typke, D. & Pfeifer, F. (1998).** Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology* **144** (Pt 5), 1331-1342.
- Oren, A. (1994).** The ecology of the extremely halophilic. *FEMS Microbiol Rev* **13**, 415-440.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 334-348.
- Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 56-63.
- Orphanides, G., Lagrange, T. & Reinberg, D. (1996).** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* **10**, 2657-2683.
- Pain, V. M. (1996).** Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* **236**, 747-771.
- Palmer, B. R. & Marinus, M. G. (1994).** The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **143**, 1-12.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. (1998).** Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**, 854-859.
- Pfeifer, F. & Ghahraman, P. (1993).** Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarum*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Mol Gen Genet* **238**, 193-200.
- Pfeifer, F., Griffig, J. & Oesterhelt, D. (1993).** The fdx gene encoding the [2Fe--2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Mol Gen Genet* **239**, 66-71.
- Pfeifer, F., Offner, S., Krüger, K., Ghahraman, P. & Englert, C. (1994).** Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 569-577.
- Pfeifer, F., Gregor, D., Hofacker, A., Plosser, P. & Zimmermann, P. (2002).** Regulation of gas vesicle formation in halophilic archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 175-181.
- Pfeifer, F., Kruger, K., Roder, R., Mayr, A., Ziesche, S. & Offner, S. (1997).** Gas vesicle formation in halophilic Archaea. *Arch Microbiol* **167**, 259-268.

- Porse, B. T., Cundliffe, E. & Garrett, R. A. (1999).** The antibiotic micrococcin acts on protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J Mol Biol* **287**, 33-45.
- Post, F. J. (1977).** The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol* **3**, 143-165.
- Price, N. & Proud, C. (1994).** The guanine nucleotide-exchange factor, eIF-2B. *Biochimie* **76**, 748-760.
- Qureshi, S. A. & Jackson, S. P. (1998).** Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* **1**, 389-400.
- Qureshi, S. A., Khoo, B., Baumann, P. & Jackson, S. P. (1995).** Molecular cloning of the transcription factor TFIIB homolog from *Sulfolobus shibatae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6077-6081.
- Rao, J. K. & Argos, P. (1981).** Structural stability of halophilic proteins. *Biochemistry* **20**, 6536-6543.
- Rauhut, R. & Klug, G. (1999).** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 353-370.
- Reeve, J. N., Sandman, K. & Daniels, C. J. (1997).** Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell* **89**, 999-1002.
- Reiter, W. D., Hudepohl, U. & Zillig, W. (1990).** Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9509-9513.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000).** Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798-3806.
- Roder, R. & Pfeifer, F. (1996).** Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* **142** (Pt 7), 1715-1723.
- Rodriguez-Valera, F. (1993).** Introduction to saline environments: 1-23. In Vreeland RH & Hochstein LL (ed.). The biology of halophilic bacteria. CRC Press, Inc Boca Raton, Fla.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membrane. *J Cell Biol* **38**, 337-357.
- Sambrook, & Russell (2001).** Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL. Third Edition Cold. Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sartorius-Neef, S. (2000).** Untersuchungen zur Translation von Gasvesikelgenen in halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU-Darmstadt.
- Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **51**, 579-588.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schleper, C., Puhler, G., Kuhl Morgen, B. & Zillig, W. (1995).** Life at extremely low pH. *Nature* **375**, 741-742.
- Sehgal, S. N. & Gibbons, N. E. (1960).** Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium*

cutirubrum. *Can J Microbiol* **6**, 165-169.

Sensen, C. W., Klenk, H. P., Singh, R. K., Allard, G., Chan, C. C., Liu, Q. Y., Penny, S. L., Young, F., Schenk, M. E., Gaasterland, T., Doolittle, W. F., Ragan, M. A. & Charlebois, R. L. (1996). Organizational characteristics and information content of an archaeal genome: 156 kb of sequence from *Sulfolobus solfataricus* P2. *Mol Microbiol* **22**, 175-191.

Severini, M., Spurio, R., La Teana, A., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1991). Ribosome-independent GTPase activity of translation initiation factor IF2 and of its G-domain. *J Biol Chem* **266**, 22800-22802.

Shear, H. & Walsby, A. E. (1975). An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planktonic blue-green algae. *BR Phycol J* **10**, 241-251.

Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1342-1346.

Shporer, M. & Civan, M. M. (1977). Pulsed nuclear magnetic resonance study of 39K within halobacteria. *J Membr Biol* **33**, 385-400.

Shukla, H. D. & DasSarma, S. (2004). Complexity of gas vesicle biogenesis in *Halobacterium* sp. strain NRC-1: identification of five new proteins. *J Bacteriol* **186**, 3182-3186.

Simon, R. (1981). Morphology and protein composition of gas vesicles from wild type and gas vacuole deficient strains of *Halobacterium salinarum* strain 5. *J Gen Microbiol* **125**, 103-111.

Slupska, M. M., King, A. G., Fitz-Gibbon, S., Besemer, J., Borodovsky, M. & Miller, J. H. (2001). Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *J Mol Biol* **309**, 347-360.

Soppa, J. (1999). Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. *Mol Microbiol* **31**, 1295-1305.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.

Stoeckenius, W. & Kunau, W. H. (1968). Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *J Cell Biol* **38**, 337-357.

Tetart, F. & Bouche, J. P. (1992). Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. *Mol Microbiol* **6**, 615-620.

Thomm, M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 159-171.

Tindall, B. (1992). The family Halobacteriaceae., in: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, Ed., *The Prokaryotes*. SpringerVerlag, Berlin: 768-808.

Tolstrup, N., Sensen, C. W., Garrett, R. A. & Clausen, I. G. (2000). Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **4**, 175-179.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

Uchiumi, T. & Kominami, R. (1997). Binding of mammalian ribosomal protein complex P0.P1.P2 and protein L12 to the GTPase-associated domain of 28 S ribosomal RNA and effect on the accessibility to

anti-28 S RNA autoantibody. *J Biol Chem* **272**, 3302-3308.

Udagawa, T., Shimizu, Y. & Ueda, T. (2004). Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria. *J Biol Chem* **279**, 8539-8546.

Wagner, G., Hartmann, R. & Oesterhelt, D. (1978). Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur J Biochem* **89**, 169-179.

Walsby, A. E. (1972). Structure and function of gas vacuoles. *Bacteriol Rev* **36**, 1-32.

Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. *Microbiol Rev* **58**, 94-144.

Walsby, A. E. & Nichols, B. W. (1969). Lipid composition of heterocysts. *Nature* **221**, 673-674.

Walsby, A. E. & Hayes, P. K. (1989). Gas vesicle proteins. *Biochem J* **264**, 313-322.

Watanabe, H., Gojobori, T., Miura, K. & Watanabe, H. (1997). Bacterial features in the genome of *Methanococcus jannaschii* in terms of gene composition and biased base composition in ORFs and their surrounding regions. *Gene* **205**, 7-18.

Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-4579.

Zhilina, T. N. & Zavarzin, G. A. (1979). Comparative cytology of methanosarcinae and description of *Methanosarcina vacuolata* sp. nova. *Microbiology (engl. Übersetzung von Mikrobiologiya)* **48**, 223-228.

Zillig, W., Stetter, K. O. & Janekovic, D. (1979). DNA-dependent RNA polymerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem* **96**, 597-604.

Zimmermann, P. & Pfeifer, F. (2003). Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Mol Microbiol* **49**, 783-794.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Amonium-Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	steht für die Basen Cytosin oder Guanosin oder Thymin
bidest.	bidestilisiertes H ₂ O
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
D	steht für die Basen Adenin oder Guanosin oder Thymin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanin
<i>gvpX</i>	Gen X aus dem Gasvesikeloperon
GvpX	Genprodukt X aus <i>gvpX</i>
H	steht für die Basen Adenin oder Cytosin oder Thymin
kDA	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m7G	methyl-7-Guanosin
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
μ	Mikro
ng	Nanogramm
nm	Nonometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylenglycolsorbitolmonolaurat
U	Units
V	Volt
V	steht für die Baasen Adenin oder Cytosin oder Guanosin
s.	siehe
bzw.	Beziehungsweise

Anhang

Lebenslauf

Name	Simone Sartorius-Neef geb. Sartorius	
Geburtstag	20.10.1970	
Geburtsort	Einhausen	
Schulausbildung	1977-1981	Grund- und Hauptschule Einhausen
	1981-1982	Hauptschule Einhausen
	1982-1991	Gymnasium Liebfrauenschule Bensheim
	1991	Abitur
Erwerbstätigkeit	1991-1994	Berufsausbildung zur Arzthelferin
Akademische Ausbildung	1994-2000	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
	2000	Diplomprüfung
	2000	Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt
	2001-2005	Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt

Erklärungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Zeit von Jan 2000 bis Dez 2004 angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 14.12.2004

(Simone Sartorius-Neef)